

Elävien potilasperäisten kasvainviljelmien käyttö rintasyövän immuno-onkologisessa tutkimuksessa

Kasper Matias Mahlamäki  
Lääketieteen kandidaatti  
Lääketieteellinen tiedekunta  
Helsingin yliopisto

Helsinki 8.7.2019  
Tutkielma  
Ohjaajat Dos Juha Klefström & MSc Rita Turpin

[kasper.mahlamaki@helsinki.fi](mailto:kasper.mahlamaki@helsinki.fi)

# HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Lääketieteen laitos	
Tekijä – Författare – Author Kasper Matias Mahlamäki			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Elävien potilasperäisten kasvainviljelmien käyttö rintasyövän immuno-onkologisessa tutkimuksessa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Onkologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävä tutkielma	Aika – Datum – Month and year 1/2019-8/2019	Sivumäärä – Sidoantal - Number of pages 46+5	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Syöpätautien yleisyys lisääntyy kaikkialla maailmassa väestön vanhetessa ja Suomessakin todetaan vuosittain noin 35 000 uutta syöpää, joihin kuolee noin 13 000 henkeä. Syövän lääkehoidon painopiste on siirtymässä laajalti elimistön soluja tuhoavista sädehoidosta ja solunsalpaajista kohti potilaan omaa immuunipuolustusta syöpää vastaan ohjaavia immuno-onkologisia lääkkeitä. Immuno-onkologisilla lääkkeillä, kuten tarkastuspiste-estäjiin kuuluvilla PD-1-vasta-aineilla on saavutettu jopa pysyviä remissioita useassa vaikeahoitoisessa syövässä. Valitettavasti vain pieni osa immunologisilla syöpälääkkeillä hoidetuista potilaista saa niiden täyden hyödyn ja hoitovasteen laajentaminen koko potilasjoukkoon on osoittautunut ongelmalliseksi.</p> <p>Tutkielmani kirjallisuuskatsauksessa käsitellään rintasyöpää yleisesti, sekä syvennytään rintasyövän prekliinisiin tutkimusmalleihin ja rintasyöpäpotilaan immuno-onkologiavasteen ennustetekijöihin. Kokeellisen laboratoriotutkimusosuuden tavoitteina oli korreloida rintasyöpäntäytteen leukosyytti-infiltraation taso kasvaimen Myc- ja PD-L1-ekspressioon, mitata solulinjojen ja tutkimusryhmämme kehittämien PDEC-eksplanttien immuuniaktivaatiota, sekä arvioida näiden tutkimusten tulosten avulla rintasyöpäpotilaan kasvainnäytteestä kasvattamiemme PDEC-kudosviljelmien potentiaalia rintasyövän immuno-onkologisessa tutkimuksessa.</p> <p>Löysin tutkimalla primäärikasvainten ja PDEC-eksplanttien ominaisuuksia immunohistokemialla sekä qRT-PCR:llä korrelaation primäärikasvaimen leukosyyttimäärän sekä PDEC-viljelmien qRT-PCR:llä mitatun immuuniaktiivisuuden välille: kasvaimen korkea leukosyyttipitoisuus vaikuttaa olevan yhteydessä PDEC-viljelmien suurempaan immuuniaktiivisuuteen. Mielenkiintoista oli havaita, että vaikka immuunisolujen aktivoimiseen käytetyn Immunocultin tulisi aktivoida kaikkia T-soluja, niin edes runsas kasvaimen strooman leukosyytti-infiltraatio ei aiheuttanut qRT-PCR:llä tehdyissä immuuniaktivaatiomittauksissa menetelmän käyttöä häiritseviä vääriä positiivisia tuloksia. Tulosteni perusteella PDEC-eksplantit kykenevät kuvaamaan rintasyöpäpotilaiden kasvainkohtaisia immuuniaktivaatioeroja, mikä korostaa niiden soveltuvuutta immuno-onkologiseen tutkimukseen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Breast cancer, immunotherapy, biomarker, translational research, cell culture			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## Sisällysluettelo

1 Johdanto .....	1
2 Kirjallisuuskatsaus.....	2
2.1 Rintasyöpä ja sen luokittelu .....	2
2.2 Rintasyövän prekliiniset tutkimusmallit .....	8
2.3 Immuunipuolustus .....	15
2.4 Immuno-onkologia .....	21
3 Tavoitteet .....	31
3.1 Rintasyöpänäytteiden leukosyytti-infiltraation korreloiminen kasvaimen Myc- ja PD-L1-ekspressioon .....	31
3.2 PDEC-viljelmien immuunisoluaktivaation mittaaminen qRT-PCR:llä ja menetelmän tutkimuspotentiaalin arvioiminen .....	32
4 Tutkimusaineisto ja -menetelmät .....	32
4.1 Aineisto .....	32
4.2 Menetelmät .....	33
5 Tulokset.....	38
5.1 Rintasyövän primäärikasvaimen Myc-ekspressiossa sekä lymfosyytti-infiltraatiossa on potilaskohtaisia eroja .....	38
5.2 PDEC-viljelmien immuunisoluaktivaatiota voidaan mitata qRT- PCR:llä .....	39
5.3 PDEC-viljelmien vaste immuunisoluja stimuloivaan lääkkitykseen on korreloitavissa primäärikasvaimen ominaisuuksiin .....	41
6 Pohdinta .....	43
Lähteet ja liitteet .....	47

# 1 Johdanto

Syöpätautien yleisyys lisääntyy kaikkialla maailmassa väestön vanhetessa ja Suomessakin todetaan vuosittain noin 35 000 uutta syöpää, joihin kuolee noin 13 000 henkeä (1). Syövän lääkehoidon painopiste on siirtymässä laajalti elimistön soluja tuhoavista sädehoidosta ja solunsalpaajista kohti potilaan omaa immuunipuolustusta syöpää vastaan ohjaavia immuno-onkologisia lääkkeitä. Lääkkeillä on saavutettu jopa pysyviä remissioita pienillä haittavaikutuksilla useassa vaikeahoitoisessa syövässä, mutta valitettavasti vain pieni osa hoidettavista potilaista saa niistä optimaalisen hyödyn. Yksi merkittävimmistä immuno-onkologisen hoidon suunnittelua ja käyttöä tällä hetkellä rajoittavista ongelmista on luotettavasti potilaiden lääkevastetta ennakoivien ennustetekijöiden puute. Yhden potilaan hoito esimerkiksi immuunisolujen uupumista estävällä PD-L1-vasta-aineella maksaa vuodessa kymmeniä tai jopa satoja tuhansia euroja (2), joten syöpäpotilaiden joukosta täytyy saada valittua ne, jotka hyötyvät immuno-onkologisista lääkkeistä kaikista eniten.

Uusien syöpähoitoa mullistavien löydösten translaatiota valmiiksi potilaita hyödyttäväksi lääkkeiksi hidastaa myös potilaan syöpää luotettavasti laboratoriossa mallintavien prekliinisten tutkimusalojen puutos (3). Kaksiulotteiset solulinjat eivät kykene kuvaamaan syövän ja sen mikroympäristön välisiä monipuolisia vuorovaikutuksia, joten viime vuosina on alettu kehittämään potilaan syöpänäytteestä soluviljelykaapissa kasvatettavia kolmiulotteisia kudoksia. Yksi näistä on Juha Klefströmin tutkimusryhmän Helsingissä kehittämät PDEC (patient-derived explant culture) -viljelmät, joiden on osoitettu säilyttävän kasvaimen mikroympäristö, syövän heterogeenisyys ja solujen vuorovaikutukset primäärikasvaimen kaltaisina myös soluviljelyolosuhteissa (4). Pysin itse jatkamaan PDEC-viljelmien kehitystä osoittamalla niiden käyttökelpoisuuden rintasyövän immuno-onkologiseen tutkimukseen ja korreloimalla viljelmiä saatua tutkimustietoa muilla käytössä olevilla tutkimusmenetelmillä saatavaan potilaskohtaiseen tietoon.

## 2 Kirjallisuuskatsaus

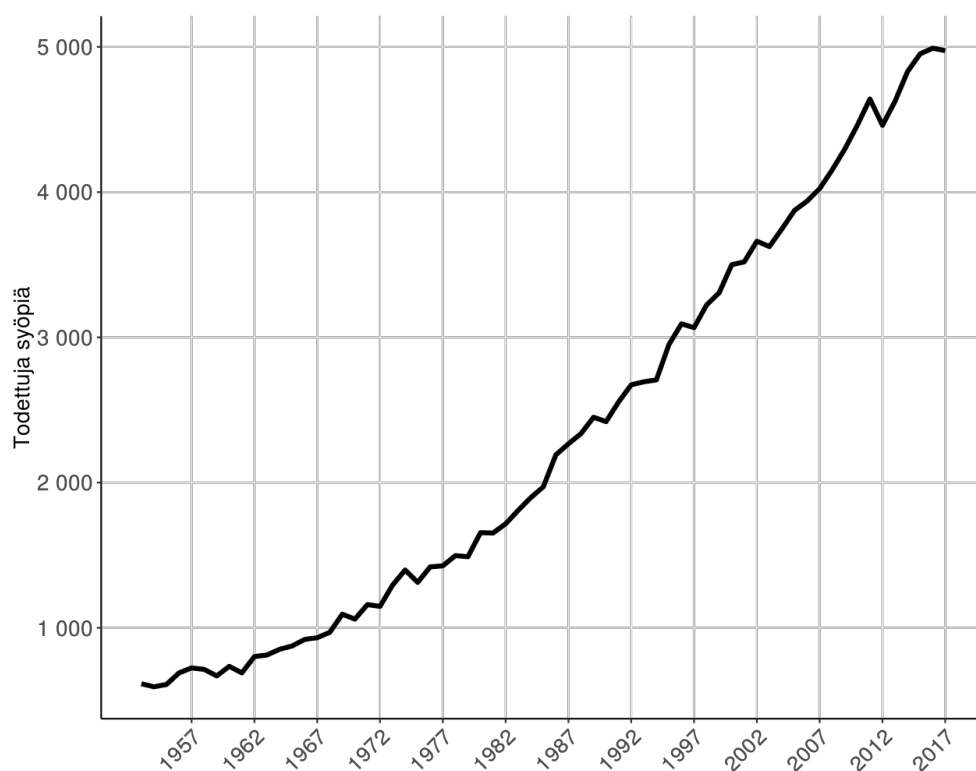
### 2.1 Rintasyöpä ja sen luokittelu

#### 2.1.1 Rintasyövän epidemiologia

Rintasyöpä on kaikki syöpäpotilaat huomioitaessa toiseksi yleisin ja ylivoimaisesti naisten yleisin syöpä (5). Suomessa diagnosoidaan uusia potilaita vuosittain noin 5000 ja yli 10% naisista sairastuu rintasyöpään jossain vaiheessa elämäänsä (kuvaaja 1). Rintasyöpää esiintyy myös miehillä, mutta tauti on paljon naisten rintasyöpää harvinaisempi ja uusia tapauksia todetaan Suomessa vuosittain vain noin 30 (6). Rintasyöpä löydetään useimmin postmenopausaalisilta naisilta 60-69 vuoden iässä, mutta ilmaantuvuus on korkealla tasolla myös tätä nuoremmilla (kuvaaja 2).

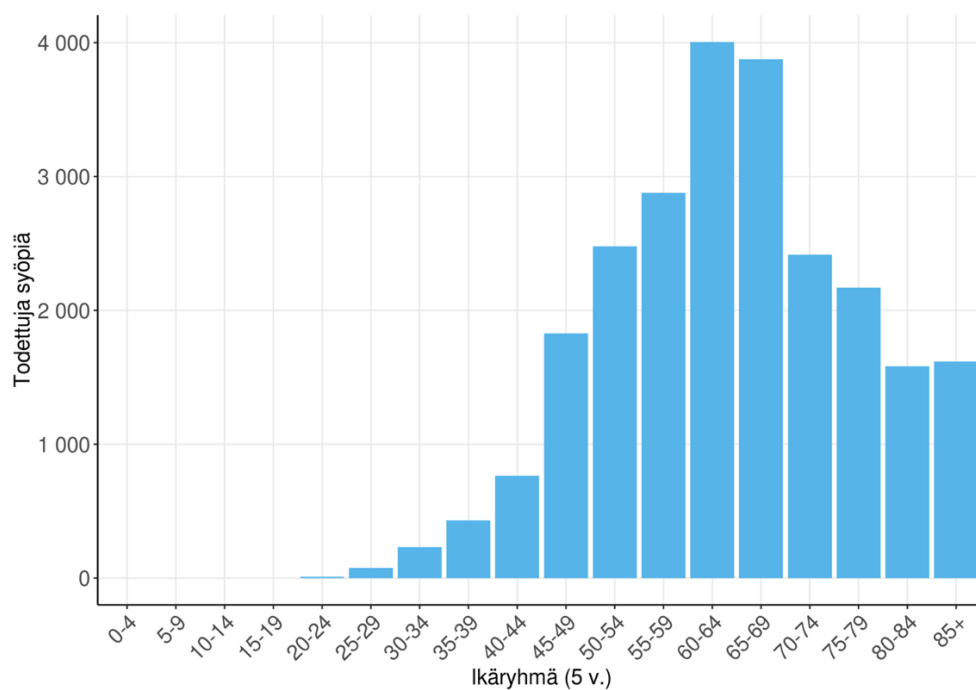
Rintasyövän ennuste on parantunut merkittävästi viime vuosikymmenten aikana ja nykyään yli 90% Suomessa todetuista potilaista on elossa viiden vuoden kuluttua diagnoosista, kun vielä 1950-luvulla vastaava luku jäi alle 50%:n (7). Ennusteen paranemiseen on vaikuttanut erityisesti 50-69-vuotiaisiin naisiin kohdistuva seulontaohjelma, sekä lääkehoidon kehittyminen. Näiden ansiosta rintasyöpä diagnosoidaan nykyään usein aiempaa varhaisemmassa vaiheessa ja sen hoito toteutetaan potilaan syöpäsolujen ominaispiirteiden mukaan valittavilla täsmälääkkeillä (8). Tästä huolimatta rintasyöpä on edelleen kehittyneissäkin maissa toiseksi yleisin syöpäkuolemien aiheuttaja keuhkosityövän jälkeen (6), sillä metastasoineeseen rintasyöpään ei vielä ole parantavaa hoitoa.

© Suomen Syöpärekisteri (CC-BY 4.0) - cancerregistry.fi



Kuvaaja 1: Vuosina 1957-2017 Suomessa rintasyöpään sairastuneet.

© Suomen Syöpärekisteri (CC-BY 4.0) - cancerregistry.fi



Kuvaaja 2: Vuosina 2013-2017 Suomessa rintasyöpään sairastuneet ikäryhmittäin.

## 2.1.2 Rintasyövän etiologia

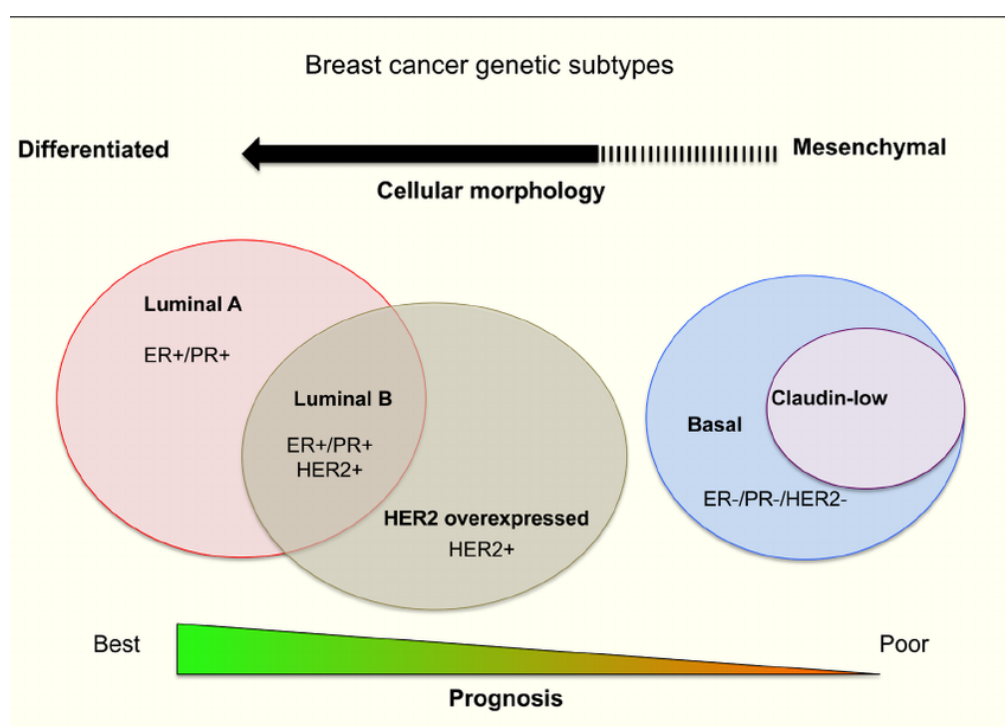
Kaikkia rintasyövän aiheuttajia ei vielä tunneta, mutta yksilön sairastumisriskiin vaikuttavat erityisesti hormonaaliset tekijät, perimä ja elintavat. Hormonaalisia tekijöitä yhdistää pitkään korkealla pysyvät estrogeeni- ja progesteronipitoisuudet, minkä vuoksi rintasyövän riski on korkeampi esimerkiksi naisilla, joiden kuukautiset ovat alkaneet aikaisin, joiden vaihdevuodet alkavat myöhään ja jotka käyttävät vaihdevuosisoireiden hoitoon hormonikorvaushoitoa yli viiden vuoden ajan. (6) Löydetyistä riskitekijöistä huolimatta noin 80% rintasyöivistä on kuitenkin yksilön perimästä tai elintavoista riippumattomien sattumanvaraisten replikaatiovirheiden aiheuttamia (9).

Arviolta 5-10% rintasyöivistä johtuu perinnöllisestä alttiudesta. Kaksi parhaiten tunnettua rintasyöpäriskiä kohottavaa geeniä ovat BRCA1 ja BRCA2. Erityisesti BRCA1-mutaatiota kantavan naisen rintasyöpäriski on muuhun väestöön verrattuna moninkertainen: suomalaisnaisista sairastuu rintasyöpään keskimäärin hieman yli 10%, mutta BRCA1-mutaation kantajilla riski on tutkimuksesta riippuen 44-78%. (8) BRCA1-geeni on tärkeä homologisella rekombinaatiolla tapahtuvassa geenivirheiden korjaamisessa ja geenin mutaation on todettu lisäävän syöpäsolun mutaatiotaakkaa. Tämä saattaa selittää BRCA1-mutaation yleisyyttä aggressiivisimpana ja vaikeahoitoisimpana pidetyssä kolmoisnegatiivisessä rintasyövässä, jota sairastavista potilaista 40-50%:n perimässä on kyseinen mutaatio. BRCA1-mutaatio on yhdistetty myös sekä korkeaan kasvaimeen tunkeutuvien lymfosyyttien määrään että immuunisolujen väsymistä aiheuttavien tarkastuspistemolekyylien PD-1:n ja CTLA-4:n ekspressioon, mikä tekee mutaatiota kantavasta populaatiosta mielenkiintoisen ryhmän uusien immunologisten syöpälääkkeiden kehittäessä. (10)

Terveellisilläkään elintavoilla ei voida täysin poistaa yksilön riskiä sairastua rintasyöpään, mutta erityisesti ylipainon, runsaan alkoholinkäytön ja vähäisen fyysisen aktiivisuuden on todettu kasvattavan sitä (8).

### 2.1.3 Rintasyöpätyypit

Vaikka rintasyövän viiden vuoden eloonjäämisennuste onkin jo kaikki tautitapaukset huomioitaessa hyvin korkea, niin taudin aggressiivisuus ja potilaiden kuolleisuus vaihtelevat taudin eri alatyypin välillä runsaasti (kuva 1). Paikallista rintasyöpää sairastavista potilaista on syövän alatyypistä riippuen elossa viisi vuotta diagnoosin jälkeen 76-98%, mutta ennusteeltaan huonoimmassa metastasoineessa kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä vastaava luku on vain 15% (11).



Kuva 1: Rintasyövän alatyypin ominaisuudet. (12)

Rinta koostuu 15-20:sta sidekudoksen toisistaan erottamasta rauhasliuskasta eli lobuluksesta, joita yhdistää toisiinsa lobuluksissa muodostettua maitoa kuljettavat pienet tiehyet eli duktukset (8). Tiehyen soluista peräisin oleva duktaalinen rintasyöpä on histologisista alatyypeistä ylivoimaisesti yleisin ja siihen kuuluu noin 80% invasiivisista rintasyövistä (13). Duktaalinen ja lobulaarinen alatyypit kattavat yhdessä 95% kaikista rintasyövistä (14), joten muut tyypit kuten medullaarinen, papillaarinen ja inflammatorinen rintasyöpä ovat selkeästi harvinaisempia (8).



Histologisten alatyyppeiden väliset erot ovat sen verran pieniä (14), että rintasyövät jaetaan myös neljään kliinisesti merkittävään alatyypin syöpäsolujen pinnallaan ilmentämien reseptorien perusteella. Reseptoriperusteinen luokittelu mahdollistaa rintasyöpäpotilaan taudinkulun tarkemman ennustamisen, sekä hoidon syövän alatyypin sopivilla täsmälääkkeillä. Reseptoriperusteisia alatyyppejä erottaa toisistaan syöpäsolujen estrogeeni- ja progesteronihormonireseptorien sekä epidermaalisten kasvutekijäreseptorien (EGFR) perheeseen kuuluvan HER2-reseptorin ekspressiotasot. Noin 70% kaikista rintasyöivistä on joko A- tai B-typin luminaalisia rintasyöpiä, jotka yliekspressoivat joko toista tai molempia hormonireseptoreita ja voidaan erottaa toisistaan solun kasvunopeutta kuvaavan Ki-67-proteiinin määrän avulla. B-typin luminaalinen rintasyöpä on muuten A-typin kaltainen, mutta kasvaa yleensä A-tyyppiä nopeammin ja on ennusteeltaan heikompia esimerkiksi HER2-reseptorin yliekspressioon johtavan geenimutaation vuoksi. (11)

HER2-positiiviseksi kutsutaan hormonireseptorinegatiivista rintasyöpää, jossa HER2 on yliekspressoitunut. Tällaiset syövät ovat yleisesti luminaalisia aggressiivisempia ja niiden ennuste on ilman täsmälääkehoitoa luminaalisia heikompia. (15) HER2-reseptorin liiallinen toimintaa saadaan kuitenkin nykyään estettyä vasta-aineilla, minkä ansiosta HER2-positiivisen rintasyövän ennuste on kohonnut luminaalisten syöpien tasolle. (11)

Kolmoisnegatiivinen eli basaalisen kaltainen rintasyöpä (triple-negative breast cancer, TNBC) kuvastaa syöpätyyppiä, jossa mikään muiden rintasyöpätyyppien täsmälääkkeissä hyödynnettävistä estrogeeni-, progesteroni- tai HER2-reseptoreista ei ole yliekspressoitunut. Tähän alatyypin kuuluu noin 15-20% rintasyöivistä ja siinä esiintyy kaikista alatyypeistä eniten syövän kasvua nopeuttavia TP53- ja BRCA1-mutaatioita (10, 12), jotka selittävät osaltaan kolmoisnegatiivisen rintasyövän aggressiivista kliinistä kuvaa ja varhaisempaa puhkeamisikää. Kolmoisnegatiivisista rintasyöivistä voidaan erottaa vielä erittäin heikosti erilaistunut ja solunsalpaajille resistentti matalaklaudiininen alatyypin, jota esiintyy runsaasti erityisesti hoidetun rintasyövän kudoksenäytteissä (12).

## 2.1.4 Rintasyövän diagnostiikka ja hoito

Rintasyöpädiagnoosin perustana toimii rintojen kliininen tutkiminen sekä röntgenkuvaus eli mammografia. Mikäli edellä mainituilla rutiinitutkimuksilla löydetään jotain normaalista poikkeavaa, niin diagnoosia varmennetaan ultraäänitutkimuksilla ja löydetyn muutoksen pahanlaatuisuutta tutkitaan biopsialla. (8)

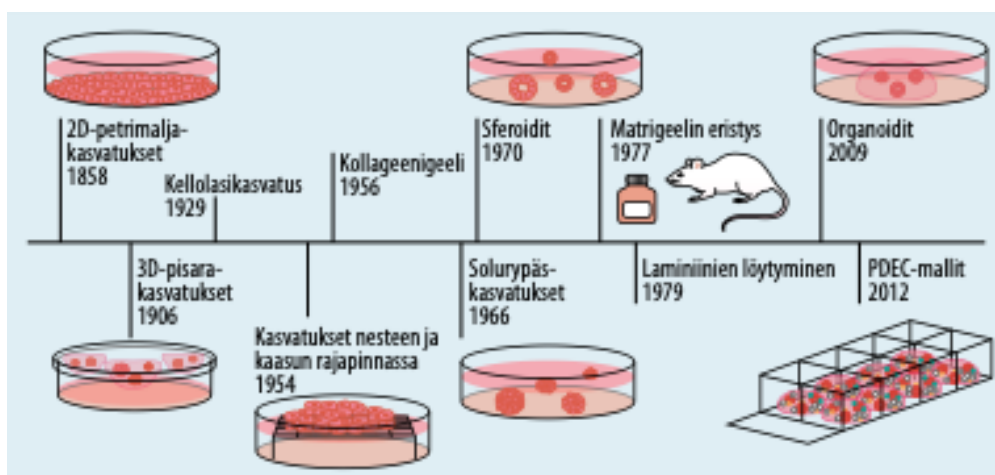
Rintasyövän hoito suunnitellaan potilaskohtaisesti ja käytetyt hoidot vaihtelevat potilaan syövän alatyypin ja levinneisyyden mukaan. Metastasoimaton rintasyöpä on usein mahdollista hoitaa kokonaan, mutta levinneen rintasyövän hoito painottuu eloonjäämiseen ja elämänlaadun parantamiseen. Rintasyövän hoito on perinteisesti alkanut aina leikkauksella, jossa poistetaan syöpäkasvaimen lisäksi tarvittava määrä rinnan ja kainalon alueen normaalia kudosta. Kirurgisten tekniikoiden kehittymisen sekä syövän levinneisyyttä kuvastavien vartijaimusolmuketutkimusten ansiosta entistä harvempi rinta on nykyään poistettava kokonaan (6, 8). Rintasyöpäleikkauksia tehdään edelleen runsaasti, mutta leikkausta ei enää pidetä kaikkien potilaiden optimaalisena ensihoitona. Erityisesti varhaisen vaiheen kolmoisnegatiivisen ja HER2-positiivisen rintasyövän hoito aloitetaan usein ennen leikkausta annettavalla lääkehoidolla eli neoadjuvanttiterapialla. (6) Tällaisella hoidolla pyritään pienentämään kasvainta, vähentämään sen kiinnittymistä ympäristöönsä ja lievittämään mahdollisen inflammatorisen rintasyövän aiheuttamia tulehdusmuutoksia niin, että leikkaus on mahdollinen (8).

Hormonireseptoriposiitivisen rintasyövän lääkehoitoon käytetään estrogeenin syövän kasvua stimuloivaa vaikutusta estävää antiestrogeenia (tamoksifeeni) tai aromataasi-inhibiittoria. HER2-positiivista rintasyöpää hoidetaan reseptorin toimintaa estävällä vasta-aineella, kuten trastutsumabilla. Mikäli täsmälääkkeillä ja leikkauksella ei saavuteta toivottua hoitovastetta, niin niiden lisäksi voidaan käyttää useita eri solunsalpaajia ja sädehoitoa. (8)

## 2.2 Rintasyövän prekliiniset tutkimusmallit

Parantunut ymmärrys syöpäsolujen ja muun niitä ympäröivän kudoksen vuorovaikutuksista on ohjannut syöpätutkimusta kaikkia nopeasti jakaantuvia solu- ja tappavista sädehoidosta sekä solunsalpaajista kohti turvallisempien täsmälääkkeiden kehitystä. Ymmärrys rintasyövän patogeneesistä ei rajoitu enää pelkästään syöpäsolujen mutaatioihin, vaan syövän kasvua ohjaa nykykäsityksen mukaan myös esimerkiksi elimistön vaihtelevien olosuhteiden aiheuttamat valintapaineet ja syöpäsolujen sekä niitä ympäröivän verisuonituksen, immuunisolujen, rasvasolujen ja sidekudoksen väliset vuorovaikutukset (16). Nykyisin käytössä olevat prekliiniset tutkimusmallit soveltuvat hyvin esimerkiksi yksittäisten onkogeenien merkityksen tutkimiseen, mutta eivät valitettavasti kykene kuvaamaan syövän ja ihmiselimistön muiden solujen vuorovaikutuksia luotettavasti (kuva 2).

Liian paljon elimistön monimutkaisia toimintoja yksinkertaistavat prekliiniset tutkimusmallit aiheuttavat pelkästään onkologisissa lääketutkimuksissa vuosittain miljardien eurojen kustannukset, sillä solu- ja eläinkokeissa tehokkaita vaikuttavista lääkeaihoista yli 90% epäonnistuu klinisen vaiheen tutkimuksissa muun muassa näiden vuoksi (16). Olemassa olevien prekliinisten kasvainmallien merkitys säilyy varmasti jatkossakin, mutta niiden rinnalle tarvitaan syövän toimintaa kokonaisvaltaisemmin kuvaavia tutkimusalueita.



Kuva 2: Solu- ja kudosisviljelyn kehitys 1800-luvun loppupuolelta nykyyhetkeen. (16)

### 2.2.1 Solulinjat

Syöpäsoluviljelmillä on perinteisesti tarkoitettu petrimaljalla elatusliuoksen ravintoaineilla eläviä syöpäsoluklooneja (16). Solulinjoja on käytetty yli vuosisadan ajan kudosten erilaisten in vivo -toimintojen taustalla olevien solutason mekanismien tutkimiseen ja niiden avulla voidaan määrittää hyvin esimerkiksi solujen vasteita mielenkiinnon kohteina oleviin ärsykkeisiin (17). Syöpäsoluviljelmien käyttö on muihin tutkimusmalleihin verrattuna hyvin helppoa ja edullista: solulinjoja on saatavilla monipuolisesti erityyppisistä kudoksista eristettynä ja niiden ylläpitoon riittää muutaman päivän välein tehtävä rutiininomainen solujen jakaminen sekä elatusliuoksen vaihto. Solulinjoilla saatujen tutkimustulosten toistettavuus on myös usein hyvällä tasolla, sillä kaikki viljelmän solut saavat elatusliuoksesta saman määrän ravinteita ja kasvutekijöitä (17).

Vaikka soluviljelmässä esiintyisikin useita eri solutyyppejä, niin tällaisessa homogeenisessa muovimaljaympäristössä kasvavat solut eivät kuitenkaan pysty jäljittelemään aidon syöpäkudoksen vuorovaikutuksia tai lääkevastetta, sillä todellisuudessa syövän olosuhteet elimistössä vaihtelevat hyvin paljon sekä eri kudosten välillä että yhden kasvaimen sisällä. (16) Potilasmateriaalista eristetyt solut käyvät läpi suuren määrän selektiota ja adaptaatioita, sillä vain pieni osa primaarinäytteen soluista pärjää kaksiulotteisessa viljelmässä, eikä saatu solulinja siten kykene edustamaan alkuperäisen kasvaimen monimuotoisuutta (18). Tasaiseen muovipintaan kiinnittyminen muuttaa myös solujen muotoa ja aiheuttaa niille elimistön kasvuolosuhteista poikkeavia ärsykeitä, mikä saattaa vääristää solulinjoilla saatuja tutkimustuloksia entisestään (17).

### 2.2.2 Jyrsijämallit

Vaikka eläinkokeiden eettisyydestä on ollut paljon keskustelua, niin jyrsijät ovat edelleen välttämättömiä esimerkiksi onkogeenien ja syövän kehittymismekanismien tutkimuksessa, sekä potentiaalisten lääkekandidaattien

tutkimisessa ennen kuin niitä voidaan antaa potilaille. Jyrsijät ovat myös kohtalaisen edullisia ja erilaisten linjojen saatavuus on hyvällä tasolla. Jyrsijöiden ja ihmisen elimistöt eivät kuitenkaan vastaa toisiaan täydellisesti, eikä lupaavien prekliinisten tulosten translaatio valmiiksi potilaita hyödyttäväksi lääkkeiksi useinkaan onnistu. Jyrsijämallien luotettavuutta ja sovellettavuutta uusien syöpähoitojen tutkimukseen voidaan parantaa esimerkiksi muodostamalla CRISPR/Cas9-tekniikalla siirtogeenisiä jyrsijäkantoja, joiden perimässä on jokin tärkeä ihmisen syöpään liittyvä mutaatio. Tekniikalla on onnistuttu luomaan esimerkiksi hiirikantoja, jotka eivät hylji ihmispotilaasta eristettyä kasvainmateriaalia. (19)

### 2.2.3 Kolmiulotteiset soluviljelymallit

Liian yksinkertaisten tutkimusmallien aiheuttamia ongelmia pystytään parhaiten välttämään kehittämällä potilaan omasta syöpäkudoksesta kaikki kasvaimen solut sisältäviä soluviljelykaapissa kasvatettavia malleja. Tällaisten syöpäkudostymien on osoitettu säilyttävän suuri osa syövän kudostympäristöstä ja eri solutyypin välisistä vuorovaikutuksista, mutta oikean kasvainkudoksen viljeleminen laboratorio-olosuhteissa ei ole helppoa ja potilasperäisten mallien koon rajat määrittää ravinteiden, aineenvaihduntatuotteiden sekä kaasujen kulkeutuminen kudokseen ja sieltä pois. Liian suuren syöpänäytteen viljeleminen aiheuttaa kasvaimen sisälle hapen ja ravinteiden puutetta, mikä vaikuttaa herkästi solujen väliseen signalointiin sekä johtaa kasvaimen ytimen nekroosiin. Suuren kudospalan viljelemiseen liittyviä ongelmia voidaan ratkoa kahdella eri tapaa: optimaalisen kokoisia kudosta mallintavia rakenteita voidaan kasvattaa soluista tai potilaan syöpäkudosta voidaan pilkkoa kasvaimen alkuperäisen monimuotoisuuden säilyttäviin pieniin osiin. (16)

Kasvainmallien suuri potentiaali on johtanut usean eri potilasperäisen tutkimusalan kehittämiseen, mutta niiden kliinistä merkitsevyyttä haittaa vielä tällä hetkellä standardoitujen protokollien puuttuminen ja eri mallien välisten tulosten vertailun vaikeus. Mallien luotettavuuteen vaikuttaa usein myös

kasvaimen heterogeenisyyden aiheuttama selektio, sillä pieni viljelyyn käytettävä kasvainnäyte ei välttämättä pysty edustamaan koko kasvaimen ominaisuuksia (20).

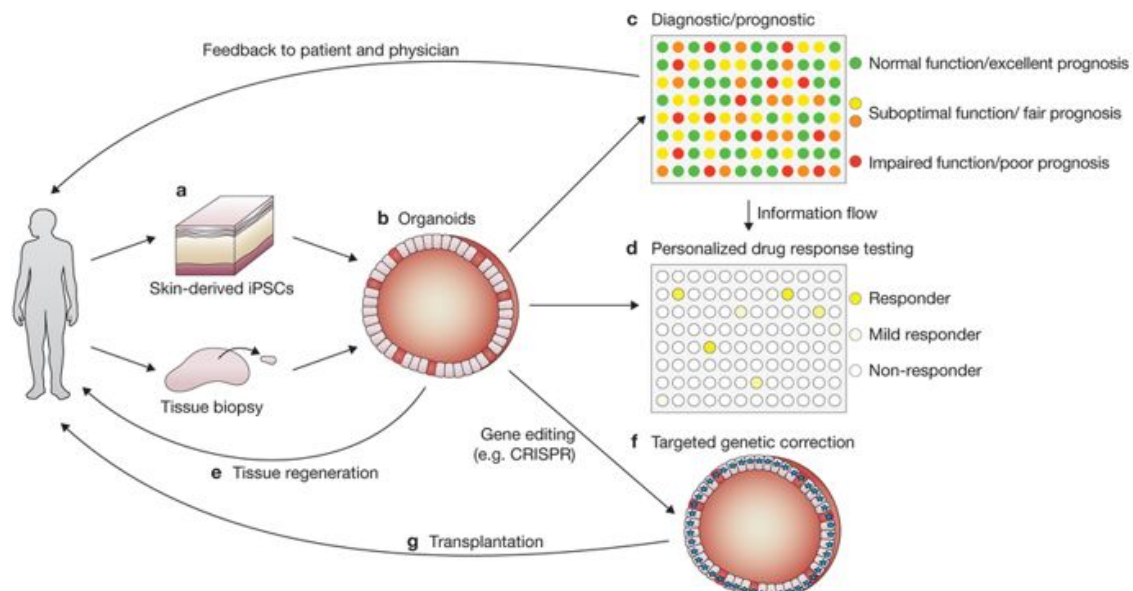
### 2.2.3.1 Organoidit

Organoidit ja sferoidit ovat kolmiulotteisia soluryppäitä, joita voidaan kasvattaa esimerkiksi syövän mikroympäristössä jäljittelevässä 3D-matriisissa tai muiden tukirakenteiden varassa soluviljelymaljalla. 2000-luvulla kehitetyt organoidit ovat pitkälti jo vuonna 1970-keksittyjen sferoidien kaltaisia (kuva 2), mutta ne koostuvat sferoideista poiketen useasta eri solutyypistä sekä kykenevät jäljittelemään mallinnetun kudoksen kehitystä ja järjestymään kudokselle tyypillisiksi rakenteiksi solujen geneettisen informaation mukaan. Kolmiulotteisten sferoidien ja organoidien kasvattaminen on tavallisia kaksiulotteisia soluviljelmiä kalliimpaa, mutta ne soveltuvat kuitenkin monimutkaisemman rakenteensa ansiosta solulinjoja paremmin esimerkiksi lääkekandidaattien valintaan, sekä kasvaimen ja immuunisolujen vuorovaikutusten tai angiogeneesin tutkimiseen (kuva 3). Organoidien kasvattaminen vaatii tarkasti valitun kudoksen in vivo -kasvu ympäristössä jäljittelevän kasvutekijä- ja ravinnesekoituksen, joiden löytymisen ansiosta tarkasti alkuperäisen kudoksen toimintaa ja epiteelirakennetta kuvaavia organoideja voidaan kasvattaa nykyään sekä kasvain- että kantasoluista (18).

Organoideilla tehdyn tutkimuksen kliinistä merkitsevyyttä voidaan parantaa esimerkiksi muodostamalla kryosäilötyistä organoideista niin kutsuttuja eläviä biopankkeja, joiden avulla tutkijat voivat hyödyntää myös muualla kasvatetuilla organoideilla saatuja tutkimustuloksia esimerkiksi ennustetekijöiden ja lääkeherkkyyden välisten korrelaatioiden tutkimuksessa (18). Rintasyöpänäytteestä peräisin olevien organoidien on osoitettu myös säilyttävän sekä niiden alkuperäisen kasvaimen histologinen tyyppi että hormoni- ja HER2-reseptorien ekspressiotasot, mikä edelleen korostaa organoidien soveltuvuutta rintasyöpätutkimukseen (21).

Syöpäsoluista koostuvien sferoidien voidaan ajatella jäljittelevän verisuonettomia mikrometastaaseja, ja ne mallintavat hyvin osaa sekä kasvainsolujen että kasvainsolujen ja mikroympäristön välisistä vuorovaikutuksista. Myös sferoidien geeniekspressioprofiilien on todettu olevan paljon lähempänä syöpäpotilaan kasvaimen kuin kaksisolotteisen soluviljelmän geeniekspressiota. Koska sferoidit pystyvät kasvamaan yli 400-600µm läpimittaan, niin nekroottisen ytimen muodostuminen niiden sisälle täytyy huomioida sferoidien käyttöä suunnitellessa. Organoiditutkimuksen edistyksestä huolimatta sferoidit tulevat säilyttämään merkityksensä syöpätutkimuksessa myös tulevaisuudessa, ja seuraavan sukupolven sferoideihin liittyy todennäköisesti monimutkaisempien soluväli tilan rakenteiden sekä muiden solutyypin yhdistämistä kasvainsoluihin. (20)

Vaikka kolmiulotteiset organoidit ja sferoidit kuvaavatkin syövän toimintaa kaksisolotteisia solulinjoja paremmin, niin myös niistä puuttuu immuno-onkologisten lääkkeiden toiminnalle välttämättömät immuunisolut, minkä vuoksi ne eivät ole optimaalisia tutkimusmalleja moderniin syöpälääketutkimukseen.



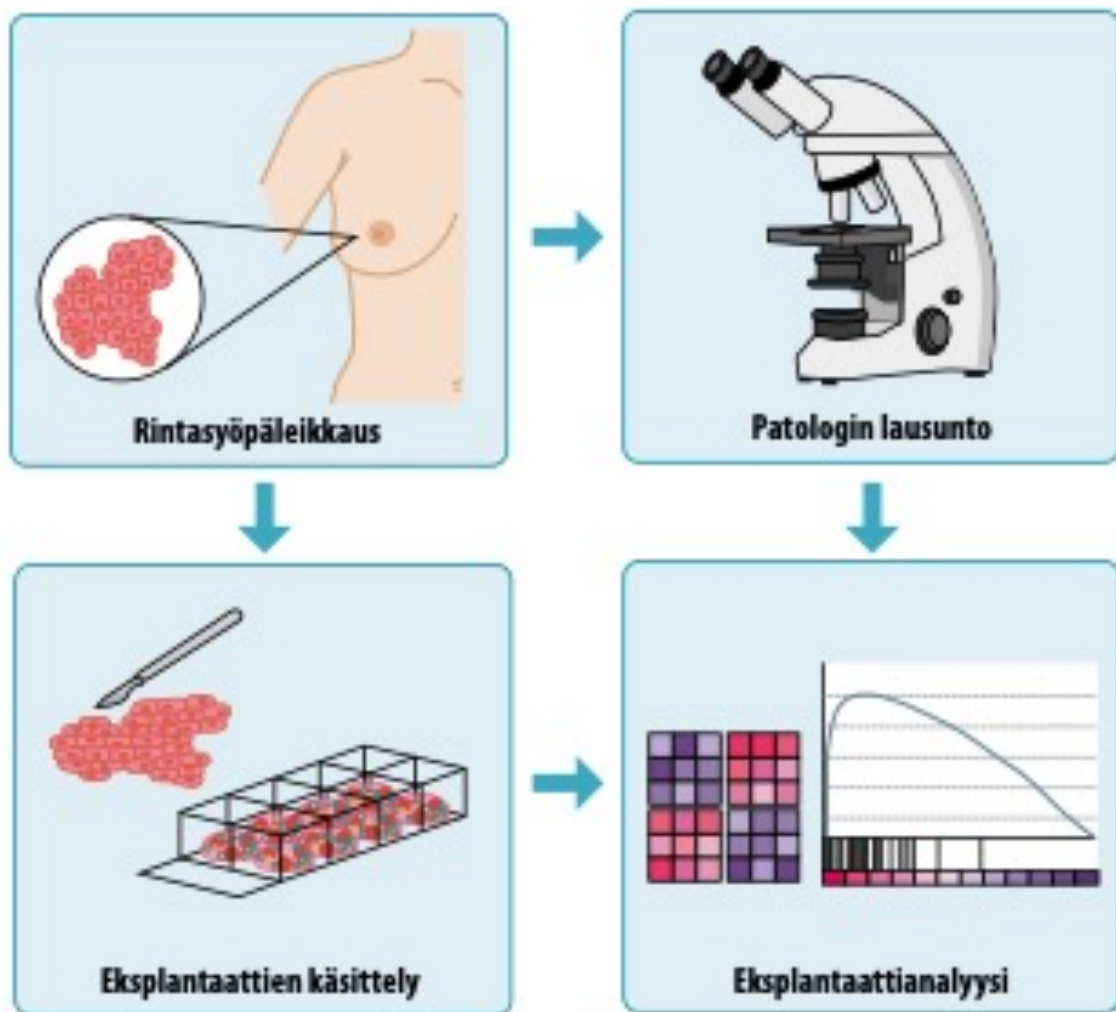
Kuva 3: Esimerkkejä organoidien sovelluksista tutkimuksessa. (22)

### 2.2.3.2 PDEC-viljelmät

Potilasperäiset eksplanttiviljelmät (patient-derived explant cultures, PDEC) on Juha Klefströmin tutkimusryhmän Helsingissä kehittämä kolmiulotteinen kasvainmalli, jossa kirurgisesta operaatiosta kuten rintasyöpäleikkauksesta tai rintojen pienennysleikkauksesta saatu kudoksenäyte pilkotaan entsyymikäsittelyllä lääkeaineiden, ravinteiden ja aineenvaihduntatuotteiden diffuusion kannalta optimaalisiin läpimitaltaan 60-200µm oleviin soluryppäisiin. Kudoksenäytettä voidaan pilkkomisen jälkeen käsitellä lääkkeillä, ennen kuin saadut fragmentit laitetaan kasvamaan syöpäkasvaimen strooman fyysistä rakennetta mallintavaan geeliin ja solujen tarvitsemat ravinteet sisältävään elatusliuokseen. Tällöin kaikki alkuperäisen kasvaimen solut sisältävät PDEC-viljelmät säilyvät hengissä soluviljelyolosuhteissa jopa kuukauden. (16) Mallin on todettu säilyttävän potilaan kasvaimen mikroympäristö sekä siihen kuuluvat syövän ja immuunipuolustuksen vuorovaikutukset pitkälti primäärikasvaimen kaltaisina, sekä kuvaavan hyvin potilaiden välistä ja kasvaimen sisäistä heterogeenisyyttä. (4, 16) PDEC-viljelmien lisäksi kirurgilta saadusta potilasnäytteestä otetaan palat immunohistokemiaa ja nukleiinihappojen sekvensointia varten, jolloin lopputuloksena yhdestä syöpänäytteestä saadaan valtava määrä erilaista potilaan kliiniseen kuvaan korreloitavissa olevaa aineistoa (kuva 4), mikä luo hyvän pohjan monipuoliselle ja luotettavalle yksilölliselle syöpätutkimukselle.

Kasvainkudos ei kuitenkaan ole PDEC-viljelmissä fysiologisessa ympäristössään, joten happi, ravinteet, immuunisolut tai lääkeaineet eivät kulkeudu siihen systeemisesti. Näistä puutteista huolimatta PDEC-viljelmät tekevät laboratoriolöydöksistä selkeästi kliinisesti merkittävämpiä ja tehostavat perustutkimuksen translaatiota potilaita hyödyttäväksi lääkkeiksi. Tulevaisuudessa PDEC-viljelmiä voidaan ehkä tuottaa leikatun primaarikasvaimen ja biopsioiden lisäksi potilaan verinäytteestä saaduista kiertävistä kasvainsoluista, jolloin mallin käyttökohteet laajenisivat myös metastasoineen syövän tutkimukseen. (16)





Kuva 4: Rintasyöpäleikkauksessa poistetusta kasvainmateriaalista viedään näyte sekä patologille että PDEC-viljelmillä tehtäviin tutkimuksiin. Patologin diagnoosi huomioidaan tulkittaessa PDEC-viljelmistä saatuja tutkimustuloksia. (16)

### 2.2.3.3 Muut potilasperäiset kasvainmallit

Soluviljelyalustalle voidaan luoda myös tiettyä syövän kasvuun tai leviämiseen kuuluvaa vaihetta kuvaavia tutkimusmalleja. Yksinkertaisimmassa asetelmassa syöpäsoluja kasvatetaan tyvikalvoa kuvastavan membraanin yhdellä puolella, ja tutkitaan niiden kykyä tunkeutua kalvon läpi kohti sen toisella puolella olevaa, soluja luokseen houkuttelevaa viestiatinetta. (20) Näitä niin kutsuttuja ”transwell-based” malleja voidaan hyödyntää esimerkiksi kasvainsolujen migraation,

invaasion ja metastasoimisen tutkimiseen, sekä tulevaisuudessa kenties myös esimerkiksi potilaan omien solujen invaasiopotentiaalin selvittämiseen.

Myös verisuonten mallintaminen laboratorio-olosuhteissa tulee olemaan tulevaisuudessa tärkeässä asemassa prekliinisessä syöpätutkimuksessa, sillä ne mahdollistavat syövän kasvulle elintärkeiden ravinteiden pääsyn soluille, sekä erittävät syövän kasvua nopeuttavia ja hidastavia tekijöitä (23). Verisuonten sisäpinnan endoteelisoluja voidaan jo kasvattaa esimerkiksi solujen liikkeitä soluväliaineen säikeiden välissä kuvaavien mikrofluidisten laitteiden kollageenista tai elastiinista koostuvien kanavien sisäpinnalle, jolloin saadaan luotua alkeellisia versioita syövän kasvulle elintärkeistä verisuonista. (20) Soluviljelytekniikoiden kehitys tulee todennäköisesti johtamaan olemassa olevien kasvainmallien yhdistelmiin ja erityisesti kantasolujen kyky muodostaa kudusrakenteita organogeneesin kautta tulee luultavasti olemaan tärkeässä asemassa nykyistä luotettavampien kasvainmallien kehityksessä (20).

## 2.3 Immuunipuolustus

Immuunipuolustus on kehittynyt suojelemaan isäntäänsä jatkuvasti muuntautuvilta patogeenisilta mikrobeilta sekä limakalvojen kautta elimistöön pääseviltä myrkyllisiltä ja allergeenisilta aineilta. Samalla kun immuunijärjestelmä suojaa elimistöä sille vaarallisilta mikrobeilta ja aineilta, niin sen täytyy kyetä välttämään elimistön omiin rakenteisiin tai hyödyllisiin normaaliflooran bakteereihin kohdistuvia reaktioita. Immuunivasteiden kohdentaminen perustuu patogeeneistä ja myrkyllisistä aineista löytyviin elimistölle vieraisiin molekyyleihin, jotka immuunipuolustus kykenee tunnistamaan (24). Normaalityössä tähän pystyvät molemmat immuunijärjestelmän osat, luonnollinen ja adaptiivinen eli hankittu immunitetti, mutta sairauksissa järjestelmän toiminta saattaa häiriintyä.

## 2.3.1 Terveen henkilön immuunipuolustus

### 2.3.1.1 Luonnollinen immunitaetti

Luonnollinen immunitaetti ei vaadi mikrobialtistuksen aiheuttamaa järjestelmän kehittymistä, vaan siihen kuuluvat vasteet määräytyvät yksilön perimän mukaan. Järjestelmään kuuluu runsas määrä erilaisia vaarallisten aineiden elimistöön pääsyä estäviä fysikaalisia esteitä, elimistön nesteistä jatkuvasti löytyviä adaptiivista immuunipuolustusta aktivoivia proteiineja (komplementti), mikrobeita tuhoavia entsyymejä ja tunkeutuvien mikrobien pintarakenteita tunnistavia solujen kalvoreseptoreita. Luonnollista immunitaettia välittävät solut tunnistavat mikrobeille ja myrkyille tyypillisiä molekyyliarakenteita epäspesifisesti, joten järjestelmä kykenee reagoimaan mahdolliseen uhkaan välittömästi sen päästyä elimistöön ja on hyvin tärkeä immuunivasteen ensimmäisten päivien aikana. Luonnollisen immunitaetin soluista tärkeimpiä ovat kudoksissa valmiina olevat dendriitti- ja syöttösolut, sekä verenkierrosta infektion alkuhetkinä tulehduspaikalle saapuvat neutrofiilit, makrofagit, eosinofiilit, basofiilit ja luonnolliset tappajasolut (NK-solut) (kuva 5). (24)

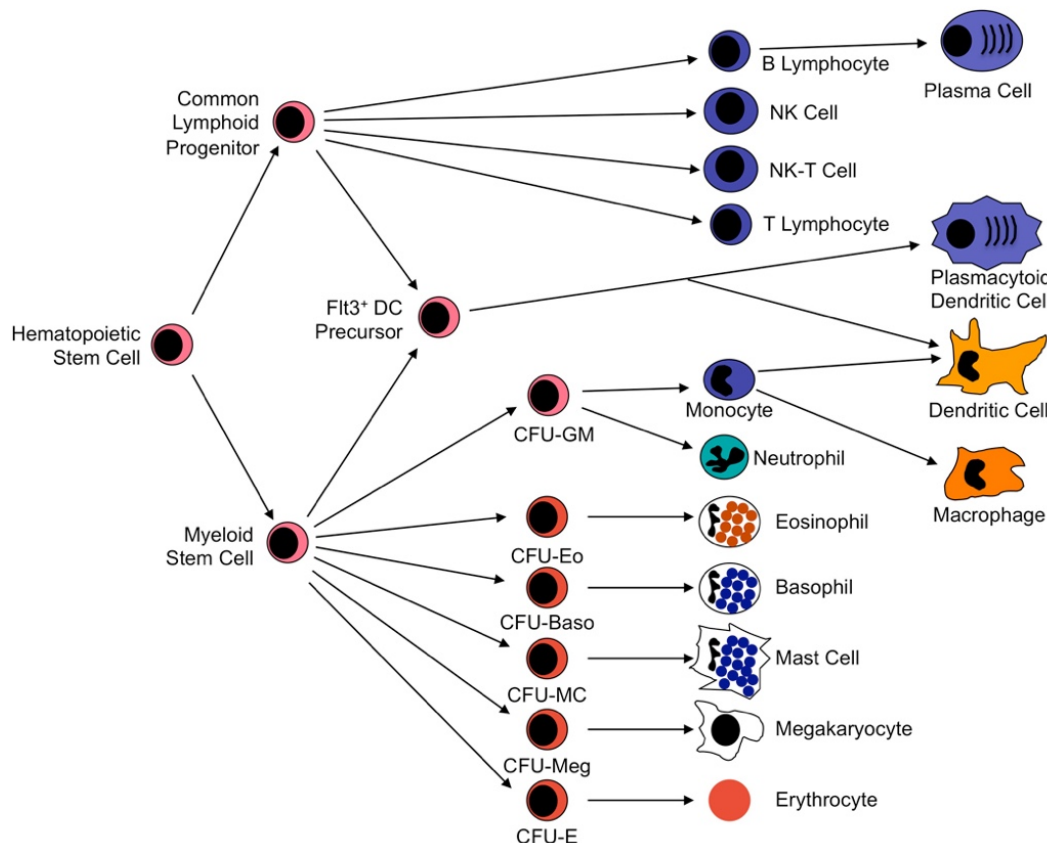
### 2.3.1.2 Adaptiivinen immunitaetti

Adaptiivisen toiminta on luonnollista järjestelmää hitaampaa, mutta se kykenee tehokkaaseen ja patogeenispesifiseen toimintaan T- ja B-lymfosyyttien pinnallaan ilmentämien antigeenispesifisten reseptoreiden ansiosta. Reseptoreita muodostuu lymfosyyttien kehitysvaiheessa somaattisen rekombinaation kautta miljoonia erilaisia, joten lymfosyytit kykenevät yhteensä tunnistamaan jokaisen mahdollisen antigeenin. Hankitulle immunitaetille on tyypillistä immunologinen muisti, jossa patogeenin ensimmäinen kohtaaminen aiheuttaa juuri tämän taudinaiheuttajan pintarakenteille spesifisten lymfosyyttien jakautumista ja yleistymistä kaikkien lymfosyyttien valtavassa joukossa. Kun sama patogeeni kohdataan toisen kerran, niin immuunivaste saadaan käynnistettyä ensimmäisellä kerralla muodostuneiden muistisolujen avulla niin

nopeasti, ettei yksilö ehdi sairastua samaan tautiin uudestaan. Muistisolut säilyvät kudoksissa lepotilassa jopa vuosikymmeniä, mutta ovat valmiina toimimaan, kun niille spesifi patogeeni pääsee elimistöön uudelleen. Tähän perustuu myös rokotteiden aiheuttama immuniteetti. (24)

### 2.3.1.3 Immuunijärjestelmän solut

Immuunivasteita välittävät valkosolut eli leukosyytit kykenevät sekä tuhoamaan elimistöön päässeitä taudinaiheuttajia ja omia vaurioituneita soluja että kommunikoimaan toistensa ja elimistön muiden solujen kanssa. Granulosyytit eli neutrofiilit, eosinofiilit ja basofiilit sekä veren monosyytit ja kudosten makrofagit kykenevät fagosytoimaan ja tuhoamaan taudinaiheuttajia sellaisenaan. Sytotoksiset lymfosyytit eli tappaja-T-solut ja NK-solut tuhoavat solunsa samoilla soluvälitteiseen pintareseptorikontaktiin perustuvilla perusmekanismeilla (kuva 5), mutta niiden aktivaatio poikkeaa toisistaan. Tappaja-T-solujen sytotoksinen vaikutus vaatii spesifistä MHC I -välitteistä antigeenitunnistusta ja soluja aktivoivaa ko-aktivaatio-signaalia, kun taas NK-solut kykenevät tunnistamaan vaurioituneet solut myös ilman MHC-kontaktia. Immuunisolujen kommunikaatio perustuu sytokiineiksi kutsuttuihin viestimolekyyleihin, joiden avulla leukosyytit pystyvät esimerkiksi vahvistamaan ja hiljentämään toistensa vasteita sekä kutsumaan muita immuunisoluja tulehduspaikalle. Tärkeimpiä sytokiinejä ovat usean eri luokan interleukiinit (IL), interferonit (IFN) ja kasvainnekroositekijät (TNF). Näitä erittävät erityisesti neutrofiilit, makrofagit, dendriittisolut ja lymfosyytit, jotka yhdessä varmistavat immuunivasteen oikeanlaisen toiminnan. (24)



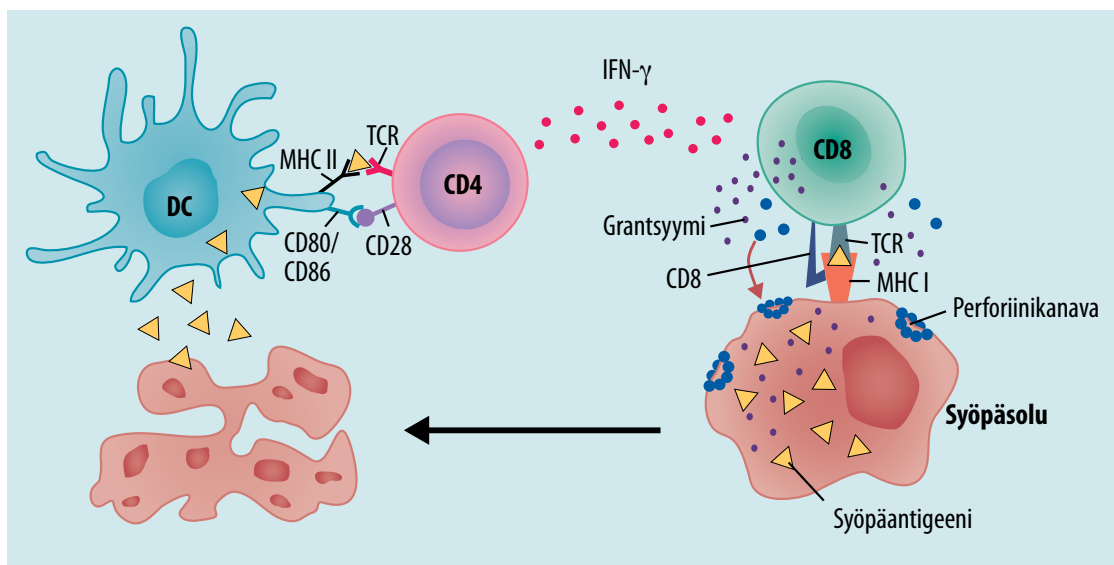
Kuva 5: Verisolut ja niiden kehitys. Lymfoidisesta kantasolusta kehittyvät B-, T- ja NK-solut. Myeloidisesta kantasolusta kehittyvät luonnolliselle immuunipuolustukselle tärkeät monosyytit, neutrofiilit, eosinofiilit, basofiilit ja syöttösolut. (24)

### 2.3.2 Immuunipuolustus syövässä

Immuunijärjestelmän syöpäsoluja tuhoava vaikutus perustuu sytotoksisten solujen kykyyn tunnistaa syöpäsolujen pinnallaan esittelemiä elimistölle vieraita antigeenejä. Syöpäantigeenejä vastaan ei ole kehittynyt täydellistä toleranssia, joten T-soluista tulee autoreaktiivisia. Syöpäantigeenit voivat olla mutaatioiden seurauksena syntyneitä uudenlaisia proteiineja eli neoantigeenejä, ajallisesti tai anatomisesti väärässä paikassa ilmeneviä proteiineja tai normaaliin verrattuna moninkertaisina määrinä esiintyviä elimistön normaaleja proteiineja. (23) Syöpään kohdistuvan immuunivasteen kannalta tärkeimpiä soluja ovat antigeenejä esittelevät dendriittisolut, immuunijärjestelmää aktivoivat auttaja-T-

solut sekä syöpäsolujen tuhoamiseen kykenevät sytotoksiset T-lymfosyytit ja NK-solut (23, 25).

Immuunivaste käynnistyy, kun antigeeniä esittelevä solut, kuten T-soluvasteen kohdentamiseen optimaalisina pidetyt dendriittisolut, fagosytoivat syöpäsoluista vapautuneita syöpäantigeneja ja esittelevät niitä auttaja-T-soluille (kuva 6) (26). Näistä erityisesti Th1-solut aktivoituvat solujen CD80/CD86- ja CD28-pintaproteiinien vuorovaikutuksesta saamiensa kostimulatoristen signaalien avulla ja alkavat erittämään immuunipuolustusta aktivoivia sytokiineja kuten interferoni gammaa. Auttaja-T-solujen lisäksi interferoni gammaa erittyy myös luonnollisista tappajista NK- ja NK T -soluista. Interferoni gamma -välitteinen immuunivaste aiheuttaa erityisesti sytotoksisten lymfosyyttien, NK-solujen, makrofagien ja monosyyttien aktivaatiota sekä tehostaa sytotoksisten lymfosyyttien jakautumista. (27)



Kuva 6. Syöpäantigeenien aiheuttama immuunivaste. (23)

Sytokiinit aktivoivat edelleen tappaja-T-solut tuhoamaan syöpäsoluja, joiden MHC I -pintamolekyyleissään esittelemiä syöpäantigeneja ne tunnistavat T-solureseptoreillaan. (23, 27) Sytotoksiset T-lymfosyytit ja NK-solut tuhoavat kohdesolunsa samoilla kahdella perusmekanismilla. Ensimmäisessä mekanismissa tappajasolujen kuolemaligandit (TNF-alfa, Fas-ligandi) sitoutuvat tuhottavien kohdesolujen kuolemareseptoreihin ja ohjaavat kohdesolun

kaspaasivälitteiseen apoptoosiin. Toinen ja tehokkaampi sytotoksinen mekanismi perustuu tappajasolujen sisäisten granuloiden proteiinien vapautumiseen (kuva 6). Tässä grantsyymi B:tä (GZMB) ja perforiiniä (PRF) sisältäviä rakkuloita kuljetetaan kohti tappaja- ja kohdesolun välistä immunologista synapsia, jossa niiden sisältö vapautetaan eksosytoosilla. Rakkulat fuusioituvat kohdesolun solukalvoon, johon perforiini muodostaa grantsyymi B:n pääsyn solun sisälle mahdollistavia huokosia. Grantsyymi B aktivoi kohdesolun sisällä sekä suoraan apoptoosia aiheuttavia 3- ja 7-tyypin kaspaaseja että mitokondrioiden sisäiseen aktivaatioreittiin kuuluvan Bcl-2-perheen Bid:n kautta proapoptoottisia Bax- ja Bak-proteiineita. Tämä johtaa sytokromi C:n vapautumiseen mitokondriosta ja edelleen kohdesolun apoptoosilla tuhoavan apoptosomin muodostumiseen sytosolissa. Mikäli tappajasoluilta puuttuu toimiva grantsyymi B esimerkiksi mutaation vuoksi, niin perforiini 1 saattaa kyetä tuhoamaan kohdesolunsa myös itsenäisesti. (25)

Syöpäsolut pyrkivät selviytymään ja syövän kasvaessa niihin kohdistuvan valintapaineen vuoksi solut kehittävät ympärilleen puolustusjärjestelmää lamauttavan mikroympäristön (23, 28). Immuunipuolustusta lamaavat mekanismit ovat hyödyllisiä T-solujen perifeerisen toleranssin ylläpitämisessä ja esimerkiksi autoimmuunisairauksien kehittymisen estämisessä, mutta ne myös rajoittavat T-solujen taistelua syöpää vastaan (28). Immuno-onkologian kannalta tärkein immuunivasteita vaimentava mekanismi on tulehduksen kroonistuessa lisääntyvä jarru- eli tarkastuspistemolekyylien ilmeneminen, sillä T-solujen aktiivisuus riippuu pitkälti niiden saamien kostimulatoristen ja -inhibitoristen signaalien suhteesta (23, 28). Jarrumolekyyli kilpailevat T-soluja aktivoivien pintamolekyylien kanssa samoista kostimulatorisista reseptoreista, joten tulehduksen kroonistuessa lisääntyvä jarrumolekyylien määrä johtaa immuunisolujen toiminnan heikentymiseen ja solujen apoptoosiin (28).

Kaksi eniten tutkittua ja immuno-onkologisissa lääkkeissä hyödynnettyä tarkastuspistemolekyyliä ovat CTLA-4 ja PD-1/PD-L1 (kuva 7). Näistä ensimmäisen vaikutus on suurimmillaan immuunivasteen käynnistyessä, kun aktivoitunut T-solu alkaa ilmentää CTLA-4-reseptoria, jonka vuorovaikutus dendriittisolujen CD80/CD86-molekyylien kanssa rajoittaa T-solujen aktivaatiota

ja jakautumista. Toinen tärkeä immuunivasteita sammuttava tarkastuspiste on immuuni- ja syöpäsolujen välinen PD-1/PD-L1-vuorovaikutus. Tulehduksen kroonistuessa syöpäsolut alkavat ilmentää pinnallaan PD-L1- ja PD-L2-ligandeja, jotka aiheuttavat T-solujen väsymistä sitoutuessaan niiden PD-1-reseptoriin. (23) Korkeaa PD-L1-ekspressiota pidetään yleisesti syövän heikentyneen immuunivasteen merkinä ja se on yhdistetty esimerkiksi ei-pienisoluisen keuhkosyövän, munuaissolukarsinooman ja munasarjasyövän huonoon ennusteeseen (27).

Vaikka interferoni gammaa tarvitaankin T-solujen tehokkaaseen toimintaan ja pidetään yleisesti lymfosyyttejä aktivoivana antituumorisena sytokiininä, niin sen on todettu myös tehostavan syövän pakenemista immuunipuolustukselta (28). Interferoni gamma lisää syöpäsolun PD-1/PD-L1-signaalointia, mikä saattaa selittää sen lymfosyyttien väsymistä aiheuttavan vaikutuksen. Syöpäsolut tunnistavat ympäröivän kudoksen korkean interferoni gamma -pitoisuuden ja valmistautuvat tappaja-T-solujen hyökkäykseen kohottamalla PD-L1-ekspressiotaan. Tämä lamaa erityisesti kasvainspesifiset sytotoksiset lymfosyytit, eivätkä ne enää kykene tuhoamaan syöpäsoluja. (29) Immuunipuolustuksen lamautumiseen vaikuttavat merkittävästi myös kasvaimen antigeenisyyden vähenemiseen johtava syöpäsolujen alentunut MHC I -ekspressio, säätelijä-T-solujen erittämät immunosuppressiiviset sytokiinit (TGF- $\beta$ ) ja T-solujen liikettä syöpäsolujen luokse estävä fibroblastien desmoplastinen reaktio (23, 28).

## 2.4 Immuno-onkologia

Immuno-onkologiaksi kutsutaan onkologian osaa, jossa syöpää pyritään hoitamaan aktivoimalla ihmisen oma puolustusjärjestelmä hyökkäämään syöpäsoluja vastaan (2). Lymfosyyttien rikastuminen syöpäkudokseen kasvaimen tulehdusreaktion vuoksi havaittiin jo 1800-luvulla, mutta varsinainen immuno-onkologian läpimurto on tapahtunut tällä vuosikymmenellä immuunisolujen toimintaa hidastavien jarrumolekyylien toiminnan löytymisen



myötä (2, 23). Syöpäsolujen on viime vuosina huomattu aktiivisesti välttelevän immuunipuolustusta ja syöpään liittyvän kroonisen tulehduksen on havaittu edistävän kasvaimen kehittymistä (28).

#### 2.4.1 Immuno-onkologiset lääkkeet

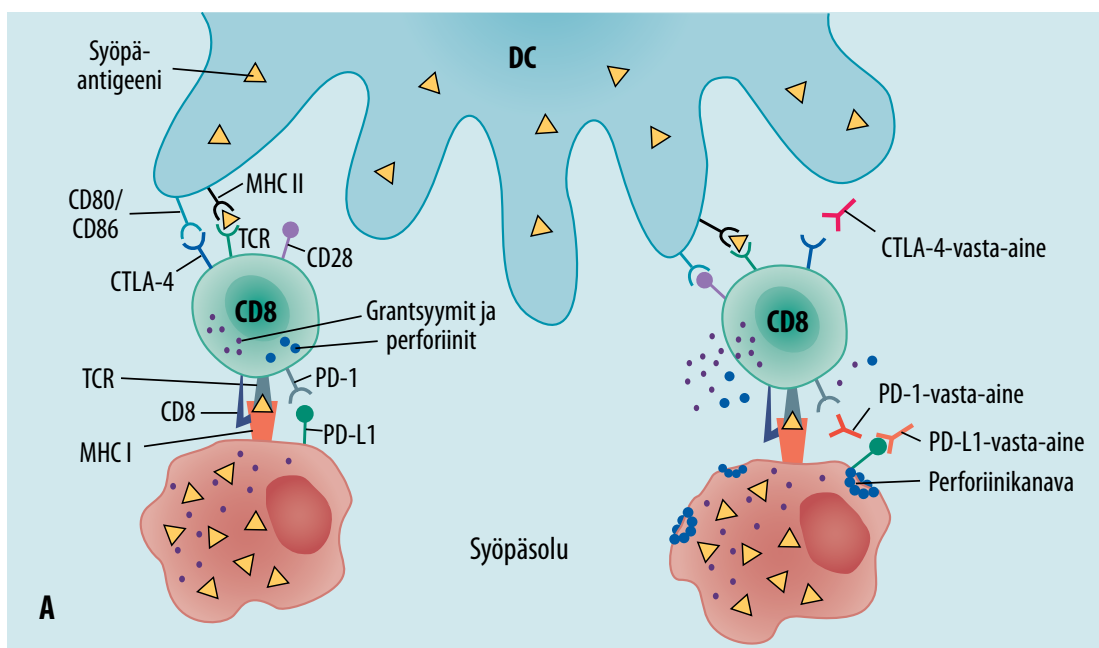
Kasvanut ymmärrys syöpäsolujen ja immuunipuolustuksen vuorovaikutuksesta on johtanut usean immuunisoluja syöpää vastaan ohjaavan hoitomuodon kehittämiseen. Merkitystä syövän lääkehoidossa kuvastaa hyvin vuoden 2018 lääketieteen Nobel-palkinto, joka jaettiin ensimmäistä kertaa historiassa syöpätutkijoille: James P. Allison ja Tasuku Honjo palkittiin CTLA4- ja PD1-tarkastuspisteiden estämisen syöpää hoitavan vaikutuksen löytämisestä. (30) Immuunijärjestelmän toimintaa ohjaavia sytokiineja, kuten interleukiini 2:sta ja interferoni gammaa on käytetty kiinteiden kasvainten hoitoon jo vuosia, mutta tarkastuspiste-estäjien löytäminen aloitti uuden aikakauden syövän immunoterapiassa (31). Tarkastuspiste-estäjien kiihdyttämää kehitystä viedään eteenpäin esimerkiksi CAR-T-soluilla, dendriittisolurokotteilla ja kaksoisspesifisillä vasta-aineilla.

Immunologisille syöpähoidoille on ominaista huomattavan pitkät remissiot tai jopa täydelliset paranemiset niissä potilasryhmissä, jotka saavat hyvän hoitovasteen. Niiden teho vaihtelee kuitenkin runsaasti sekä eri syöpätyyppien että saman syövän eri potilaiden välillä, ja hoitovasteen laajentaminen suurempaan potilasjoukkoon on osoittautunut ongelmalliseksi. (23) Lääkkeet ovat myös erittäin kalliita: esimerkiksi yhden metastasoinutta melanoomaa sairastavan potilaan hoitojakso PD-1-vasta-aine nivolumabilla tai pembrolitsumabilla maksaa 45 000-96 000 euroa ja yhdistelmä-lääkityksillä vielä huomattavasti enemmän (2). Mikäli lääkkeitä käytetään vuosia, niin hinta voi nousta satoihin tuhansiin euroihin.

### 2.4.1.1 Tarkastuspiste-estäjät

Parhaat immunologisilla syöpälääkkeillä tähän mennessä saavutetut hoitotulokset on saatu CTLA-4- ja PD-1/PD-L1-jarrumolekyylien toimintaa estävillä vasta-aineilla eli tarkastuspiste-estäjillä. Lääkkeet pyrkivät estämään jarrumolekyylien aiheuttamat syöpäsoluista immuunisoluihin kohdistuvat ko-inhibitoriset signaalit ja siten tehostamaan immuunisolujen syöpäsoluja tuhoavaa vaikutusta (kuva 7). Tarkastuspiste-estäjät ovat yleisesti solunsalpaajia paremmin siedettyjä, mutta niihin liittyy kohonnut autoimmuunisairauksia muistuttavien tulehdusreaktioiden riski. (2, 28)

Tarkastuspiste-estäjien on havaittu tehoavan parhaiten syöpiin, jotka ovat luonteeltaan hyvin immunogeenisiä eli immuunivastetta aiheuttavia. Tämä liittyy ainakin osittain tällaisten syöpien suureen mutaatiotaakkaan ja siten korkeaan syöpäsolun pinnalla esiteltynä neoantigeenien lukumäärään. Parhaat yksittäisellä immuno-onkologisella lääkkeellä saavutetut hoitovasteet on saatu PD-1-vasta-aineilla, jotka ovat olleet tehokkaita 50-60%:lla Merkelinsolukarsinoomaa ja uusiutunutta Hodgkin lymfoomaa sairastavista potilaista. Hyvä teho on saatu myös 30-40%:lla melanoomaa ja ei-pienisoluista keuhkosyöpää sairastavista potilaista. (23)



Kuva 7: CTLA-4- ja PD-L1-estäjien vaikutusmekanismit.

#### 2.4.1.2 Immunologiset soluterapiat

Syöpää voidaan hoitaa myös syöpäsoluja tuhoavia T-soluja hyödyntävillä immunologisilla soluterapioilla, joihin käytettäviä T-soluja voidaan eristää joko kasvaimesta (TIL) tai verestä. Eristyksen jälkeen solut muokataan geneettisesti joko kimeeristä antigeenireseptoria (CAR) tai antigeenispesifistä T-solureseptoria (TCR) ilmentäväksi, mikä ohjaa T-solut tuhoamaan syöpäsoluja. TIL-terapiat ovat kalliita eikä T-solujen kasvattaminen aina onnistu, mutta tutkimuksissa hoidetuista potilaista osittaisen vasteen on saanut noin 40% ja täydellisen vasteen noin 10%. Erityisesti CAR-T-solut ovat erittäin mielenkiintoinen tulevaisuuden hoitomahdollisuus, sillä nämä eivät tarvitse antigeeniä esittelevää MHC-molekyyliä kohdeantigeeninsä tunnistamiseen. CAR-T-solut eivät kuitenkaan kykene erottamaan onko kohdeantigeeni syöpäsolun vai esimerkiksi tavallisen B-solun pinnalla, joten tällä hetkellä käyttöä rajoittaa syöpäspesifisten antigeenien harvinaisuus. (23)

#### 2.4.1.3 Muut immuno-onkologiset lääkkeet

Immuunivastetta voidaan kohdistaa syöpäsoluihin myös niin kutsutuilla dendriittisolurokotteilla. Dendriittisolujen tiedetään olevan erityisen tärkeitä T-solu-vasteen käynnistämisessä, joten niitä sisältävien rokotteiden uskotaan tehostavan immuunijärjestelmän syöpää tuhoavaa vaikutusta. Ensimmäiset dendriittisolurokotteita tutkivat kliiniset kokeet alkoivat jo vuonna 1995, mutta soluviljelymenetelmien kehittyminen on edistänyt niiden tutkimusta 2010-luvulla. Dendriittisolurokotteet ovat osoittautuneet tutkimuksissa turvallisiksi sekä hyvin immunogeenisiksi ja niiden avulla aloitettu syöpään kohdistuva immuunivaste voi parhaimmillaan estää syövän kasvun jopa pysyvästi. Lupaavia tutkimustuloksia on saatu erityisesti dendriittisolurokotteiden ja tarkastuspiste-estäjien yhdistelmillä, mutta dendriittisolujen käyttö rokotteina vaatii vielä optimointia. (26)

Syöpäsoluihin kohdistuvaa immuunivastetta voidaan tehostaa myös kaksoisspesifeillä vasta-aineilla, joissa T-solun CD3-molekyyli liitetään

kasvainsolun pintamolekyyliin. Kontakti aktivoi T-solut ja aiheuttaa tehokkaan soluvälitteisen solukuoleman. Tällä mekanismilla toimiva blinatumomabi on jo käytössä tavanomaiselle hoidolle resistentin akuutin lymfoidisen leukemian hoidossa, mutta muissa syöissä kaksoisspesifiset vasta-aineet ovat vasta kehitysvaiheessa. (23)

## 2.4.2 Rintasyövän immuno-onkologia

Rintasyövän osalta immunologisten syöpälääkkeiden suurin potentiaali kohdistuu ja uusia lääkkeitä kaivataan eniten ennusteeltaan huonoimpaan ja vaikeahoitoisimpaan kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään (TNBC) (10). Rintasyöpää ei ole aiemmin pidetty immunoterapiaan hyvin vastaavana syöpänä sen matalan immunogeenisyyden vuoksi, mutta käsitys on muuttunut viime vuosien aikana muun muassa faasin III IMpassion130 -kliinisen kokeen vuoksi (10, 30). Tutkimuksessa verrattiin solunsalpaajan ja PD-L1-estäjä atetsolitsumabin yhdistelmällä hoidettujen, levinnyttä kolmoisnegatiivista rintasyöpää sairastavien potilaiden keskimääräistä elinikää solunsalpaajilla ja lumelääkkeellä hoidettuihin potilaisiin. Tutkimuksessa mukana olleet PD-L1-yliekspressoitunutta kolmoisnegatiivista rintasyöpää sairastavat potilaat elivät yhdistelmä-lääkityksen avulla keskimäärin 25 kuukautta kontrolliryhmän 15,5 kuukauteen verrattuna (10). Koska rintasyövän PD-L1-yliekspressio on assosioitu myös aggressiivisempaan taudinkuvaan (32), niin immunoterapian hyvä teho juuri tämänlaisessa rintasyövässä on tutkimuksen kannalta kannustavaa.

Immuno-onkologisten lääkkeiden potentiaalin uskotaan olevan suurin alkuvaiheen rintasyöpien neoadjuvanttihoidoissa, sillä primäärituumorit vaikuttavat metastaaseja immunogeenisemmiltä ja PD-1/PD-L1-estäjä-vasteen on havaittu olevan parempi TNBC-potilailla, joita ei vielä ole hoidettu muilla lääkkeillä. Erityisesti BRCA1-mutaatiota kantavat TNBC-potilaat saattaisivat hyötyä myös yksittäisestä immuno-onkologisesta lääkkeestä, sillä näiden

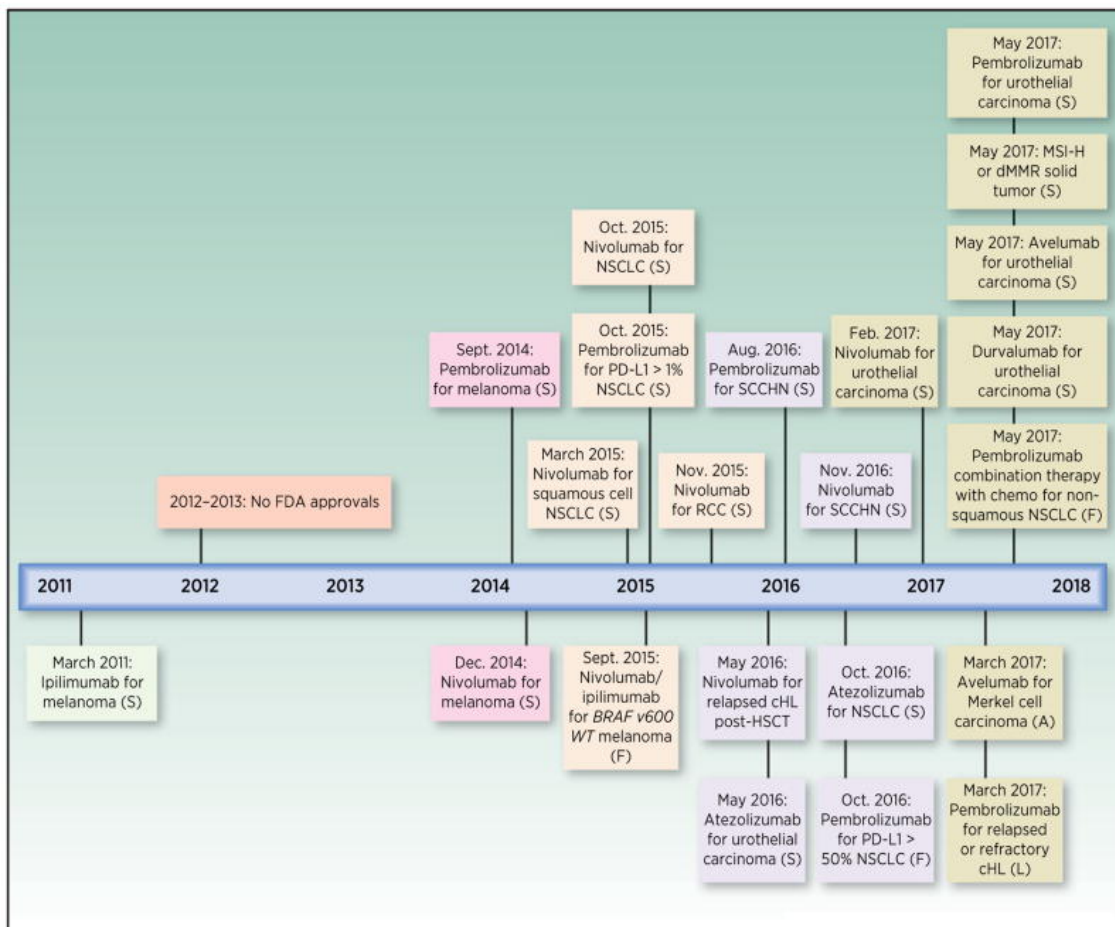
potilaiden syöpäsolujen mutaatiotaakka ja kasvaimeen tunkeutuvien lymfosyyttien määrät ovat korkeita. (10)

Immuno-onkologisten lääkkeiden merkitystä kolmoisnegatiivisen rintasyövän hoidossa lisää myös Myc-onkogeenin yhteys tähän syöpätyyppiin. Myc on rintasyövän kehitykselle tärkeä onkogeeninen transkriptiotekijä, jonka lähetti-RNA on yliekspressoitunut noin 30-50%:ssa korkea-asteisista rintasyövästä, ja yliekspression on havaittu olevan muita tyyppejä yleisempää kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä. (33-35) Myc:n yliekspressio assosioituu rintasyövän heikkoon erilaistumisasteeseen ja aggressiiviseen kasvuun, sillä Myc vie solun tilanteeseen, jossa se ei enää kuuntele kasvua rajoittavia signaaleita vaan kasvaa jatkuvasti (4). Myc:n on havaittu myös säätelevän syöpäsolujen tarkastuspistemolekyylien, kuten PD-L1:n ilmenemistä ja yleistetysti voidaan ajatella, että yliekspressoitunut Myc tehostaa syövän pakenemista immuunijärjestelmältä. Tämä tekee Myc-mutatoituneista rintasyövästä erityisen kiinnostavia tulevaisuuden immunoterapiakehityksen kannalta. (34)

### 2.4.3 Immuno-onkologinen lääkekehitys

Syövän immunoterapiamarkkinan arvon ennustetaan kolminkertaistuvan 105 miljardiin euroon (119 mrd. USD) vuosien 2016 ja 2025 välillä (31). Syksyllä 2016 jo 155 000 syöpäpotilasta osallistui yhteensä yli 800:n kliiniseen tutkimukseen (36), joista saatavaa valtavaa tutkimustiedon määrää täytyy oppia hyödyntämään ja sen täytyy olla myös muiden tutkijoiden käytettävissä resurssien hyödyntämisen optimoimiseksi. Immuno-onkologisten lääkkeiden toiminta poikkeaa perinteisistä syöpähoidoista ja niiden turvallisuuden sekä tehon arviointiin tarvitaan uudenlaisia työkaluja, jotta syöpähoitoja mullistava teho saadaan laajennettua suuremman potilasjoukon hyödyksi. Kliinisillä lääketutkimuksilla saadut tulokset eivät myöskään usein edusta koko potilasjoukkoa, sillä esimerkiksi autoimmuunisairauksia tai kroonisia virusinfektioita sairastavat potilaat suljetaan pois tutkimuksista turvallisuussyistä (36).

Immuno-onkologisen lääkekehityksen painopiste on siirtymässä yksittäisten lääkeaineiden etsinnästä synergisesti vaikuttavien lääkeaineyhdistelmien suunnitteluun (23). Esimerkiksi PD-L1- ja CTLA-4-estäjien yhdistelmillä on jo saavutettu tutkimuksissa yksittäishoitoja parempia tuloksia ja FDA hyväksyi nivolumabi/ipilimumabi-yhdistelmän metastasoineen melanooman hoitoon 2015 (28). Kyseinen yhdistelmä on kuitenkin niin kallis, ettei sen käyttäminen ole hyvistä hoitotuloksista huolimatta kustannustehokasta (30).



Kuva 8: Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirasto FDA:n hyväksymät immuno-onkologiset lääkkeet (36).

Myös perinteisillä syöpälääkkeillä, kuten joillain solunsalpaajilla, täsmälääkkeillä ja sädehoidolla on havaittu olevan immuunivasteita tehostavia vaikutuksia. Solunsalpaajat voivat lääketyypistä riippuen aiheuttaa kasvaimen mikroympäristössä useita immunomodulatorisia muutoksia, kuten tehostaa sytotoksisten T-solujen lisääntymistä, lymfosyyttien invaasiota kasvaimeen tai MHC I -antigeeniesittelyä. (10) Erityisesti solunsalpaajien ja sädehoidon on

huomattu aiheuttavan niin sanottua immunogeenistä solukuolemaa, mikä edelleen tehostaa dendriittisolujen aktivaatiota, syöpäantigeenien esittelyä solujen pinnalla ja inflammatoristen sytokiinien tuotantoa. (23, 28) Näiden yhdistämistä tarkastuspiste-estäjiin ja solunsalpaajien välisiä eroja tutkitaan useassa eri kliinisessä lääketutkimuksessa (28).

Immuno-onkologisten lääkkeiden yhdisteleminen on valitettavasti johtanut paremman tehon lisäksi myös yksittäisiin lääkkeisiin verrattuna moninkertaiseen määrään autoimmuunivälitteisiä haittavaikutuksia kuten ihottumia, maksa-arvojen kohoamista, keuhkokuumetta ja endokriinisiä autoimmuunitauteja (23). Haittavaikutusten määrän on kuitenkin havaittu korreloivan lääkkeiden annostelun ajoittamisen sekä annoskokojen kanssa, joten annostelun optimoimisella on saavutettavissa aiempaa parempi pienemmillä haittavaikutuksilla (37). Olemassa olevien immunoterapiamuotojen käyttö on laajenemassa yhä useampaan eri syöpään (kuva 8), mutta lisätutkimusta tarvitaan vielä runsaasti esimerkiksi immuunihoitojen optimaalisen annostelun ja pitkäaikaishaittavaikutusten selvittämiseksi sekä lääkkeistä todennäköisemmin hyötyvien potilaiden valintaan.

#### 2.4.4 Syöpäpotilaan immunoterapiavasteen ennustetekijät

Rintasyövän perinteisen lääkehoidon suunnittelussa käytetyt kasvaimen HER2- sekä hormonereseptoritasot ennustavat hyvin potilaan vastetta vanhemman polven lääkkeisiin, mutta immunologisten syöpälääkkeiden tehon arviointiin nämä eivät sovellu, eikä optimaalisen immunoterapiavasteen saavia potilasryhmiä ole vielä onnistuttu rajaamaan. Immuno-onkologisten ennustetekijöiden eli biomarkkerien analyyttistä luotettavuutta yritetään parantaa kehittämällä syöpäkohtaisia sekä potilaan kasvaimen että itse potilaaseen liittyviä tekijöitä huomioivia biomarkkereiden yhdistelmiä. Potilaan kannalta kaikista lupaavimpia olisivat minimaaliseen invasiivisuuteen pyrkivät verikokeista mitattavat prediktiiiset biomarkkerit, joiden avulla voitaisiin arvioida odotettavissa olevaa hoitovastetta, haittavaikutusprofiilia ja remission kestoa.

Biomarkkerikehitystä vaikeuttaa syöpäbiologian haastavuus ja ennustetekijöiden yhteisten mittaustapojen puuttuminen. Syöpäkasvaimen ja immuunisolujen välisten monimutkaisten vuorovaikutusten vuoksi kaikki immuno-onkologisten lääkkeiden vaikutusmekanismit eivät vielä ole tiedossa, eikä kaikkia potilaan lääkevasteeseen vaikuttavia tekijöitä tunneta. Tunnettujen biomarkkereiden mittaustapoja ei myöskään ole normalisoitu (30), joten vaihtelevat käsitykset positiivisesta ja negatiivisesta aiheuttavat eroja kliinisten lääketutkimusten tuloksiin ja hidastavat yhteisen näkemyksen löytymistä.

Luotettavien biomarkkerien kehityksen tärkeyttä havainnollistaa hyvin myös onkologisten kliinisten tutkimusten matalat onnistumisprosentit. Oxford Academicin katsauksen mukaan onkologisista kliinisistä tutkimuksista onnistui 2000-2015 vain 3.4%, kun kaikkien muiden lääketieteen erikoisalojen vastaavien lukujen keskiarvo oli 20.9%. Onkologiset kliiniset kokeet ovat omassa luokassaan myös kestossa. Kliinisten lääkekokeiden faasien I-III mediaanikesto oli muilla erikoisaloilla 5.9-7.2 vuotta, mutta onkologiassa 13.1 vuotta. (3)

#### 2.4.4.1 PD-L1

Syöpäsolujen korkean PD-L1-tason uskotaan lisäävän potilaan todennäköisyyttä hyötyä immunoterapiasta (38). Koska tarkastuspiste-estäjien toiminta vaatii nykykäsityksen mukaan PD-L1-ekspressiota joko kasvain- tai immuunisoluissa, niin aidosti PD-L1-negatiivisten kasvainten pitäisi olla resistenttejä lääkitykselle ja vastaavasti lääkityksen tulisi tehotia hyvin PD-L1-positiiviseen syöpään. Useissa kliinisissä lääkekokeissa on kuitenkin saavutettu hoitovasteita myös tutkimuksen mukaan PD-L1-negatiivisilla potilailla, eivätkä myöskään kaikki PD-L1-positiiviset potilaat ole vastanneet optimaalisella tavalla (39). Markkinoilla on tällä hetkellä useita PD-L1-vasta-aineita ja diagnostisia testejä, eivätkä niillä saadut tutkimustulokset ole vertailukelpoisia keskenään (38). PD-L1:n analyttistä luotettavuutta pidetään suurimpana ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä, jonka tarkastuspiste-estäjillä hoidettavien potilaiden valintaan FDA hyväksyi PD-L1-immunohistokemiavärjäyksen vuonna 2016 (kuva 8).



Kokonaisuutena PD-L1 on yksi potentiaalisimmista syöpäpotilaiden immunoterapiavasteen ennustetekijöistä, mutta sen käyttöön liittyy vielä useita kysymyksiä: pitäisikö PD-L1-tasoa mitata syöpä- vai immuunisoluista, miten näytteitä tulisi käsitellä, minkälaisia vasta-aineita tutkimuksiin tulisi käyttää ja mikä lasketaan positiiviseksi tutkimustulokseksi.

#### 2.2.4.2 Kasvaimeen tunkeutuvat lymfosyytit

Kasvaimeen tunkeutuvien lymfosyyttien (TIL) määrän on osoitettu olevan yhteydessä rintasyöpäpotilaan parempaan ennusteeseen ja rintasyövän korkeampaan immunogeenisyyteen (40). Korrelaatio on erityisen vahva tarkastuspiste-estäjillä hoidetuilla kolmoisnegatiivista rintasyöpää sairastavilla potilailla ja TIL-määrittelyn käyttöönottoa kliinisissä rintasyövän immunoterapiakokeissa valmistellaan (10). TIL-negatiiviset kasvaimet ovat merkki siitä, että immuunipuolustus kohtelee kasvainta normaalina kudoksena, joten olemassa olevaa immuunipuolustusta tehostavan immunoterapian hyvä teho on epätodennäköistä tällaisilla potilailla (32). Lymfosyyttien määrän lisäksi merkittävää on myös se, missä ne sijaitsevat ja minkälaisia lymfosyyttejä kasvaimesta löytyy. IMpassion130-tutkimuksen mukaan jo ennen hoitoa korkeat strooman TIL- ja PD-1-ekspressiotasot assosioituivat merkittävästi korkeampiin täydellisiin patologiin hoitovasteisiin tarkastuspiste-estäjillä hoidetuilla kolmoisnegatiivista rintasyöpää sairastavilla potilailla. Tutkimuksessa havaittiin myös muistisolupiirteitä ilmentävien sytotoksisten T-solujen olevan erityisen tärkeitä potilaan positiivisen ennusteen kannalta. (10)

#### 2.2.4.3 Mutaatiotaakka

Kasvainsolujen korkea somaattisten geenimutaatioiden määrä eli solujen mutaatiotaakka yhdistetään usein kasvaimen immunogeenisyyteen. Mutaatiot lisäävät elimistölle vieraiden uudenlaisten neoantigeenien ilmenemistä solussa, tehostavat niiden esittelyä syöpäsolujen MHC I -molekyyleissä ja vahvistavat

siten T-solujen syöpäsoluja tuhoavaa vaikutusta, mikä osaltaan ennustaa potilaan parempaa immunoterapiavastetta. (10) Korkea mutaatiotaakka on assosioitu parempaan ennusteeseen erityisesti ei-pienisoluista keuhkosyöpää ja melanoomaa sairastavilla potilailla (41). Mutaatiotaakan lisäksi myös syöpäsolujen korkean MHC I -ekspressiotason on todettu ennustavan potilaan parempaa immunoterapia- ja solunsalpaajavastetta. Vastaavasti MHC I -syöpäantigeeniesittelyn puutos johtaa immunoterapieresistenssiin, sillä immuunipuolustus ei kykene tunnistamaan syöpäantigeneja, ellei niitä esitellä solujen pinnalla. (28)

### 3 Tavoitteet

Tutkimus jakautui kahteen osaan: 1) rintasyöpäkasvainten immunohistokemiallinen analyysi, sekä 2) solulinjoilla ja PDEC-viljelmillä tehtävät immuunisoluaktivaatiotutkimukset.

#### 3.1 Rintasyöpänäytteiden leukosyytti-infiltraation korreloiminen kasvaimen Myc- ja PD-L1-ekspressioon

Tutkimuksen ensimmäisessä osassa pyrin edistämään rintasyöpäpotilaan ennustetekijätutkimusta osoittamalla immunoterapian toiminnan kannalta välttämättömien leukosyyttien olemassaolon rintasyövän primäärikasvaimessa, sekä tutkimaan niiden yhteyttä syöpäsolujen Myc-onkogeeniin ja immuunisoluja uuvuttavaan PD-L1-tarkastuspistemolekyyliin immunohistokemiallisilla värjäyksillä.

## 3.2 PDEC-viljelmien immuunisoluaktivaation mittaaminen ja menetelmän tutkimuspotentiaalin arvioiminen

Immuunisolujen aktiivisuus on immuno-onkologisten lääkkeiden toiminnan edellytys, joten pyrin osoittamaan, että myös ryhmämme kehittämistä PDEC-eksplanteista löytyvät immuunisolut voidaan aktivoida niitä stimuloivilla lääkkeillä. Aloitan immuunisoluaktivaatiotutkimukset varmistamalla protokollieni toimivuuden luomalla qRT-PCR-tutkimuksiin positiiviset- ja negatiiviset kontrollit solulinjoja käyttäen. HCC1806-solut ovat kolmoisnegatiivista rintasyöpää, eikä niiden interferoni gamma -mRNA:n pitoisuuden tulisi nousta, vaikka soluja stimuloisikin immuunisoluja aktivoivalla Immunocultilla. Käytän positiivisena kontrollina Jurkat T-lymfosyyttejä, joiden pitäisi reagoida Immunocultiin niin, että solujen interferoni gamma -transkriptio tehostuu.

Solulinjatutkimusten jälkeen pyrin osoittamaan, että PDEC-eksplanteista löytyvät immuunisolut voidaan aktivoida T-soluja stimuloivalla Immunocultilla ja immuunisolujen uupumista estävällä PD-L1-vasta-aineella. Tarkastuspiste-estäjät pyrkivät tehostamaan syöpäsoluihin kohdistuvaa T-soluvastetta, joten immuunisolujen aktivaation osoittaminen ja mittaaminen on olennainen osa kehittämiemme PDEC-viljelmien tutkimusta.

## 4 Tutkimusaineisto ja -menetelmät

### 4.1 Aineisto

#### 4.1.1 Solulinjat

Tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa käytettiin rintasyöpäpotilaalta eristettyjä kolmoisnegatiivisia HCC-1806 -syöpäsoluja, sekä leukemiapotilaalta peräisin olevia immortalisoituneita Jurkat T-lymfosyyttejä. Sain HCC1806-solut Johanna Anttilalta ja Aino Peuralta, sekä Jurkat-solut Shishir Pant:lta (Klefström lab).

### 4.1.2 Rintasyöpäpotilaiden kudoksenäytteet

Potilaiden rintasyöpänäytteet saatiin tutkimukseen vapaaehtoisilta rintasyöpäpotilailta, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin HUS:n luvalla (eettinen lupa 243/13/03/02/2013). Potilaiden primäärikasvaimesta leikattiin pieni pala rintasyöpäleikkauksen yhteydessä ja kuljetettiin laboratorioon, tyypillisesti alle 30 minuutissa. Laboratoriossa näyte jaettiin kolmeen osaan, joista yksi pikajäädytettiin myöhempiä DNA- ja proteiininälyyseyä varten, yksi valettiin parafiiniin immunohistokemiallisia tutkimuksia varten ja yksi prosessoitiin PDEC-kasvatusta varten. Käytin tutkimukseeni neljän touko- ja kesäkuussa 2019 HUS:ssa leikatun rintasyöpäpotilaan näytteitä, minkä lisäksi opettelin käyttämämme värjäysprotokollan toimintaa värjäämällä yhteensä 14:n vuonna 2017 leikatun rintasyöpäpotilaan näytteitä.

## 4.2 Menetelmät

Tarkemmat tiedot käytetyistä reagensseista taulukossa 1.

### 4.2.1 Solulinjojen lääkekäsittelyt

Molempia solulinjoja viljeltiin RPMI-1640 -elatusliuoksessa (Gibco), jossa oli 10% nautasikiön seerumia (fetal bovine serum, FBS, ATCC 30-2020), L-glutamiiniä ja penisilliini/streptomysiiniä. Soluja viljeltiin inkubaattorissa (37 °C ja CO<sub>2</sub>-pitoisuus 5%), Immuunisoluaktivaatioon käytettyä Immunocultia (StemCell Technologies) pipetoitiin suoraan solujen elatusliuoksen joukkoon 25µl/mL. HCC1806- ja Jurkat-soluja käsiteltiin lääkkeillä yhteensä neljä kertaa ja jokaisesta kaivosta tehtiin kaksi kopiota. Menetelmän toimivuutta seurattiin kontrolleilla, joita viljeltiin elatusliuoksessa ilman lääkekäsittelyitä. Soluja inkuboitiin lääkekäsittelyn jälkeen 72h, minkä kuluttua ne pikajäädytettiin -80 °C:n myöhempiä qRT-PCR-tutkimuksia varten.

## 4.2.2 PDEC-viljely

Eksplantteihin käytettävä kasvainnäyte hajotettiin entsyymaattisesti ja sitä inkuboitiin yön yli rauhallisella heiluttelulla (130rpm) +37:ssa Mammocult elatusliuoksessa (StemCell Technologies). Liuoksessa entsyymaattista hajotusta varten 0.2% kollagenaasi A:ta (Sigma) ja eksplanttien kasvuun tarvittavia Mammocult-proliferaatiotekijöitä (StemCell Technologies), 4µg/ml hepariinia, 0.48µg/ml hydrokortisonia, sekä 10µl/ml penisilliini/streptomysiiniä (kaikki Sigma). Seuraavana päivänä liuosta sentrifugoitiin 1300rpm:ssä 3min ajan ja saatu pelletti liuotettiin 4ml:aan PBS:ää. Tässä vaiheessa liuos jaettiin neljään eri putkeen lääkekäsittelyitä varten. Solufragmentit sentrifugoitiin uudelleen, minkä jälkeen käytetyt lääkkeet anti-PD-L1 (Genentech clone 6E11, 100µg/ml ja 500µg/ml) ja Immunocult (StemCell Technologies, 25µl/ml) pipetoitiin suoraan solupelletin joukkoon. Fragmentit liuotettiin Cultrex-3D-matriisiin (R&D Systems) ja liuosta pipetoitiin 35µl per kuoppa 8-kaivoiselle mikroskooppilasille (Nunc) PDEC-kasvatusta varten. Cultrex kovetettiin 15min inkubaatiolla 37 °C:ssa, minkä jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin 300µl Mammocult-elatusliuosta. PDEC-viljelmiä inkuboitiin 37 °C:ssa 72h, minkä jälkeen elatusliuos pipetoitiin varovaisesti pois ja näytteet pikajäädytettiin -80 celsiusasteeseen qRT-PCR-tutkimuksia varten. Fragmentit kuvattiin Olympus CK40 -valomikroskoopilla viljelyn jälkeen ensimmäisenä päivänä, sekä juuri ennen jäädättämistä 72h kuluttua neljäntenä päivänä.

### 4.2.3.1 RNA-eristys

Solu- ja kasvainnäytteistä eristettiin RNA:t RNeasy Mini -eristyskitin ohjeilla ja reagensseilla (RNeasy Mini Handbook 09/2010, Qiagen). PDEC-eksplanttien viljelyvaiheessa tehdyt jokaisen käsittelyn kaksi replikaattia yhdistettiin RNA-eristysvaiheessa suuremman RNA-loppukonsentraation saavuttamiseksi. Jurkat-solut ja potilasnäytteet kerättiin talteen 1,5ml eppendorf-putkiin RNA-eristystä varten, mutta HCC1806-solujen RNA-eristys aloitettiin pipetoimalla solurakenteen hajottavaa RLT-puskuria suoraan näytteen päälle

soluviljelymaljalle. Tämän jälkeen HCC1806-solut irrotettiin viljelymaljastaan raaputtamalla (Nunc Cell Scraper) ja eristystä jatkettiin protokollan mukaan. Näytteitä sentrifugoitiin protokollan mukaiset ajat 10 000 RPM:ssä (Heraeus Biofuge Pico). Näytteet laitettiin jälle heti eristyksen jälkeen ja valmiiden RNA-näytteiden konsentraatiot mitattiin NanoDrop ND-1000 -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific) ja ND-1000 V3.8.1 -ohjelmalla. Tämän jälkeen RNA-näytteet pikajäädettiin -80 °C:hen.

#### 4.2.3.2 cDNA-synteesi

RNA-näytteistä valmistettiin cDNA:ta Bio-Rad:n ohjeilla ja reagensseilla (iScript Reverse Transcription Supermix for qRT-PCR). Reaktio valmisteltiin jäällä kannellisille PCR-stripeille (Nibbon Genetics). Käytetyt aineet pipetoitiin järjestyksessä 1) iScript RT Supermix, 2) 100ng RNA-näytettä, 3) nukleaasi-vapaa vesi (Accugene). Varsinaiseen cDNA-synteesiin käytettiin Bio-Rad T100 Thermal Cycler:a. Valmiita cDNA-näytteitä säilytettiin -20 °C pakastimessa qRT-PCR-ajoon saakka.

#### 4.2.3.3 qRT-PCR-ajo

qRT-PCR-ajo valmisteltiin PCR-levylle (4titude) jäällä Bio-Rad:n ohjeita ja reagensseja käyttäen (iQ SYBR Green Supermix). Itse qRT-PCR-ajoon käytettiin LightCycler 480 II -laitetta (Roche) ja LightCycler 480 SW 1.5.1 -ohjelmaa.

#### 4.2.3.4 qRT-PCR-tulosten analysointi

qRT-PCR-ajosta saadut tulokset analysoitiin deltadelta Ct -menetelmällä (42). Tutkittuja geenejä interferoni gammaa, grantsyymi B:tä ja perforiini 1:tä verrattiin erikseen sekä saman näytteen GAPDH:n, että aktiini B:n määriin solujen aktiivisuustason normalisoimiseksi. Solulinjoilla saadut tulokset suhteutettiin

myös kyseisen solulinjan kontrollinäytteiden keskiarvoon. Potilaskohtaiset vaihtelut huomioitiin vertaamalla lääkekäsiteltyjen näytteiden RNA-määriä lisäksi saman potilaan kontrollinäytteeseen.

#### 4.2.4 Immunohistokemia

##### 4.2.4.1 Näytteiden valmistelu värjäyksiä varten

Rintasyöpäleikkauksista saaduista kudospaloista leikattiin pieni näyte tutkimuksen immunohistokemiallista osuutta varten. Näytettä fiksattiin 24h ajan 4% paraformaldehydissä (PFA), minkä jälkeen näyteputken neste vaihdettiin 70% etanoliin. Fiksatut kasvainnäytteet valettiin parafiiniin ja parafiiniblokeista leikattiin 4µm leikkeitä Shandon AS325-mikrotomilla.

##### 4.2.4.2 Immunohistokemialliset värjäykset

Parafiinileikkeet asetettiin 60°C lämpölevylle 15 sekunniksi kudoksen kiinnittämiseksi mikroskooppilasiin. Leikkeet deparafinisoitiin ksyleenissä (3x5min), 100% EtOH:ssa (2x3min), 96% EtOH:ssa (2x3min) ja 70% EtOH:ssa (1x3min), sekä pestiin 1x PBS:ssä (2x5min). Näytteen antigeenit tuotiin esiin lämmittämällä näytteitä 20min painekattilan höyryssä DAKO-puskurissa (1x Antigen Retrieval Buffer). Leikkeitä pestiin 1x PBS:ssä 5min, endogeenisen peroksidaasin toiminta estettiin käsittelemällä näytteitä 15min 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:lla ja näytteet pestiin uudestaan 1x PBS:ssä 5min. Pesun jälkeen leikkeet siirrettiin alumiinifoliolla peitetylle alustalle, jolla tehtävien inkubaatioiden ajaksi näytteet suojattiin parafilm-liuskalla. Leikkeille pipetoitiin 100µl MG-histopuskuria (MG Histobuffer, jossa 10% NGS:ää) ja annettiin sen vaikuttaa 20-30min. Blockauksen jälkeen jokaisen näytteen päälle pipetoitiin 50µl MG-histopuskuriin laimennettua primäärivasta-ainetta. cMyc- ja PD-L1-vasta-aineita käytettiin pitoisuudella 1:250 ja CD45-vasta-ainetta pitoisuudella 1:500. Primäärivasta-aineen annettiin vaikuttaa yön yli (noin 17h) +4°C:ssä. Inkubaation jälkeen

näytteitä pestiin 5min 1x PBS:ssä. Näytteiden päälle pipetoitiin 50µl MG-histopuskuriin suhteella 1:1000 laimennettua sekundaari-vasta-ainetta ja annettiin sen vaikuttaa 30min. Käytetyt sekundaari-vasta-aineet cMyc:lle ja PD-L1:lle goat-anti-Rabbit ja CD45:lle goat-anti-Mouse. Leikkeitä pestiin 1x PBS:ssä 5min, jonka jälkeen jokaisen näytteen päälle pipetoitiin 100µl Vectastain ABC:ta (Vector Laboratories), annettiin sen vaikuttaa 30min ja leikkeitä pestiin 1x PBS:ssä 5min. Näytteitä inkuboitiin DAB:ssa (Vector Laboratories) vetokaapissa 30s-1min, minkä jälkeen DAB:n vaikutus pysäytettiin huuhtelemalla leikkeitä hanavedessä 2-3min. Näytteitä vastavärjättiin hematoksyliinillä (Shandon) 45s-1min ajan, minkä jälkeen ne huuhteltiin taas hanavedellä. Näytteitä dehydroitiin 50% EtOH:ssa (1x1min), 96% EtOH:ssa (1x1min), 100% EtOH:ssa ja ksyleenissä (3x1min), minkä jälkeen värjätty näyte suojattiin coverslip-lasilla, joka kiinnitettiin leikkeeseen Vectamount-liimalla.

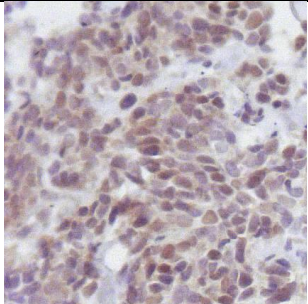
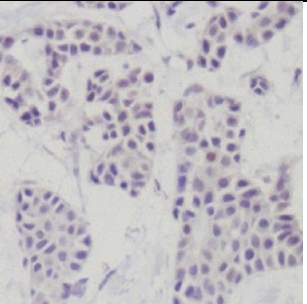
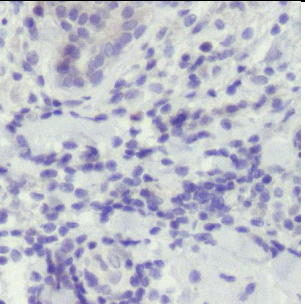
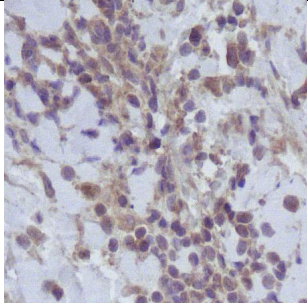
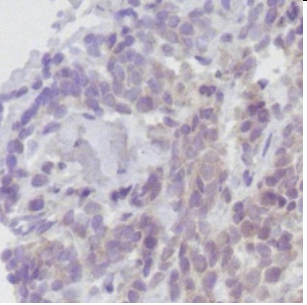
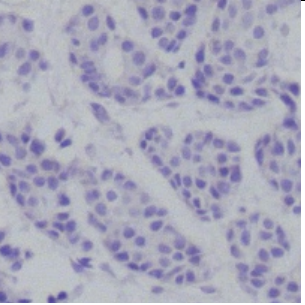
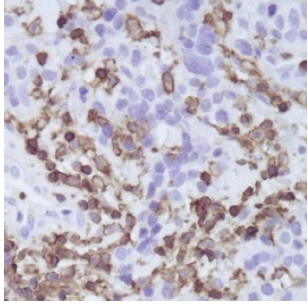
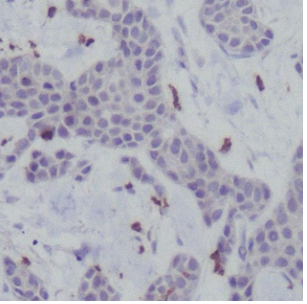
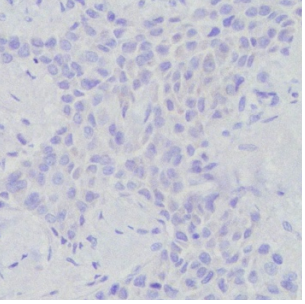
#### 4.2.4.3 Immunovärjättyjen lasien mikroskopointi ja kuvien analysointi

Näytteet kuvattiin Leica DB LB -mikroskoopilla ja Studio-Lite 1.0 -ohjelmalla (Biomedicum Imaging Unit, University of Helsinki). Tutkittavien proteiinien esiintyvyyttä näytteissä arvioitiin silmämääräisesti leikkeiden värjäytymisintensiteetin mukaan. cMyc-onkogeenin taso pisteytettiin asteikolle 0-100% sen mukaan, kuinka suuri osa solujen tumista värjäytyi (29). PD-L1- ja CD45-värjäytymisiä arvioitiin asteikolla negatiivinen/positiivinen/vahvasti positiivinen eli -/+/++. PD-L1 ja CD45 ovat solukalvolla esiintyviä proteiineita, joten muualla kuin solun pinnalla näkyviä värjäytymiä ei tulkittu positiivisiksi.



## 5 Tulokset

### 5.1 Rintasyövän primäärikasvaimen Myc-ekspressiossa sekä lymfosyytti-infiltraatiossa on potilaskohtaisia eroja

	Vahvasti positiivinen värjäytyminen	Heikosti positiivinen värjäytyminen	Negatiivinen kontrolli
cMyc			
*PD-L1			
CD45			

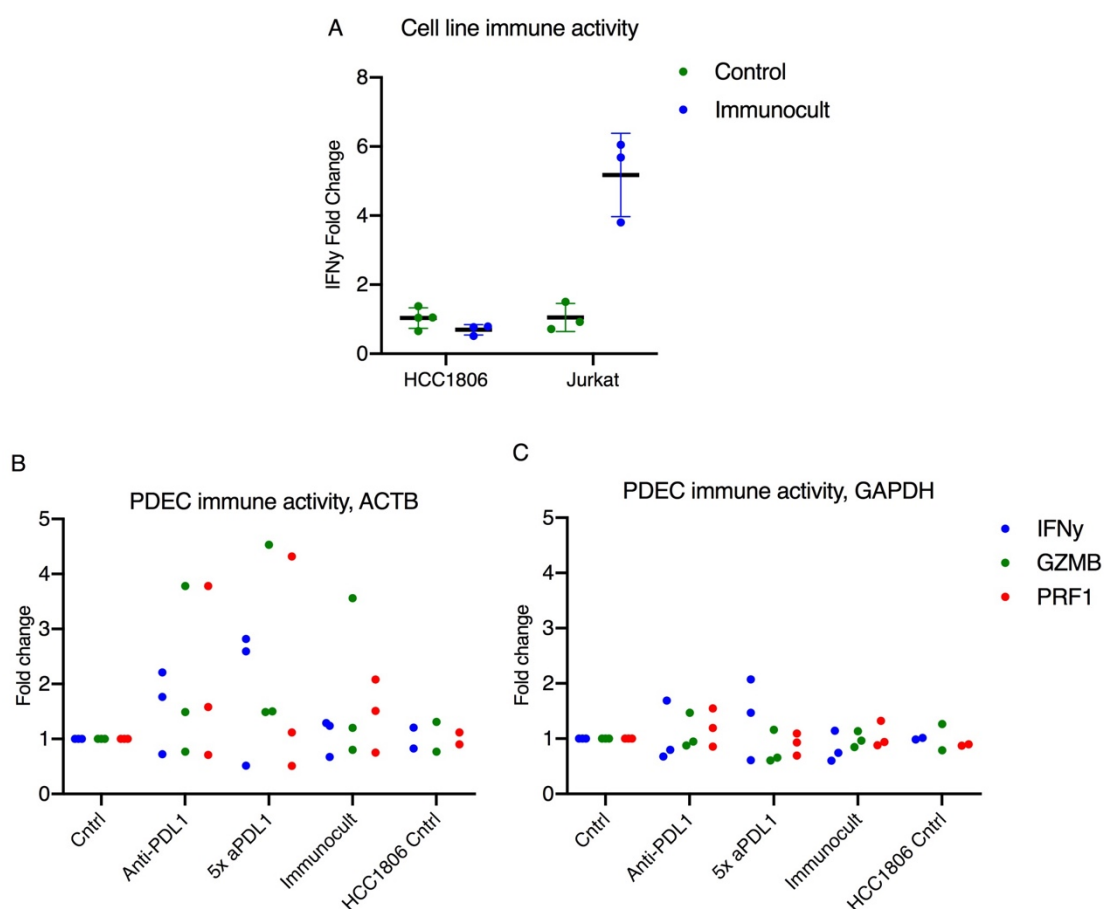
Taulukko 1: Myc-, PD-L1 ja CD45-värjäyksiä. Käytetyt konsentraatiot Myc & PD-L1 1:250, CD45 1:500. \*PD-L1-värjäyksillä saatuja tuloksia ei voida pitää luotettavina, sillä väriä näkyy tasaisesti kaikkialla soluissa, vaikka PD-L1:tä esiintyy todellisuudessa vain solukalvolla.

Värjäämistäni leikkeistä 33% (6/18) oli Myc-negatiivisia ja 44% (8/18) vahvasti Myc-yliekspressoituneita. Myc oli siis joko normaalilla tasolla tai selkeästi yliekspressoitunut noin 80%:ssa näytteistä. CD45-leukosyyttimarkkerilla

värjättyjä valkosoluja löytyi jokaisen potilaan primäärikasvaimesta, mutta niiden määrässä oli suuria potilaskohtaisia eroja. Merkittäviä eroja löytyi myös siitä, olivatko leukosyytit tunkeutuneet syöpäsolujen väleihin vai estikö syövän mikroympäristö niiden infiltraation. Koska leukosyyttejä löytyy rintasyövän primäärikasvaimesta, niin niitä voidaan olettaa olevan myös PDEC-viljelmissä.

## 5.2 PDEC-viljelmien immuunisoluaktivaatiota voidaan mitata qRT-PCR:llä

Immunocult-lääkitys tehosti Jurkat-solujen interferoni gamma -ekspressiota, muttei vaikuttanut negatiivisena kontrollina käytettyyn HCC1806-syöpäsolulinjaan (kuvaaja 3A).

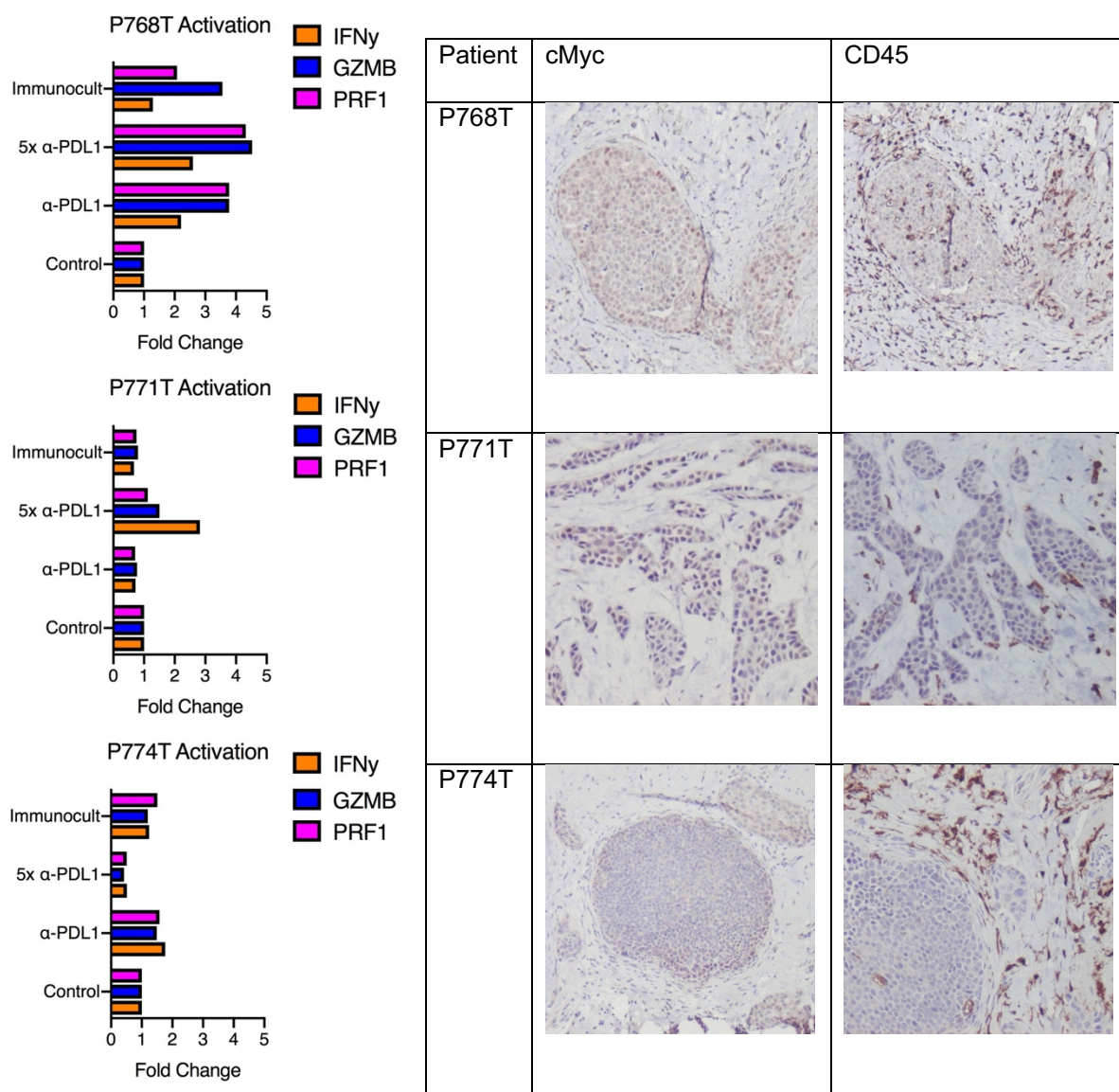


Kuvaaja 3: A) HCC1806- ja Jurkat-solujen IFN $\gamma$ -ekspression muutos vasteena Immunocultiin. qRT-PCR normalisoitu näytteiden GAPDH-tasoon. Pisteet

edustavat kolmella biologisella toistolla saatuja tuloksia. B) PDEC-eksplanttien qRT-PCR verrattuna näytteiden ACTB-tasoon. C) PDEC-eksplanttien qRT-PCR suhteessa näytteiden GAPDH-tasoon. B- ja C- kuvien pisteet edustavat kolmen tutkiman potilaan vasteita käyttämiini lääkityksiin, sekä ovat kahden samanlaisena toistetun qRT-PCR-ajon tulosten keskiarvoja.

Sekä PD-L1-estäjällä, että Immunocultilla oli vaikutusta PDEC-eksplanttien immuunisoluaaktiivisuuteen (kuvaaja 3B, 3C). Immuuniaktiivisuudessa oli selkeitä sekä potilas- että lääkeainekohtaisia eroja. Lääkitykseen vahvimmin reagoivan potilaan PDEC-eksplanttien IFN $\gamma$ -, GZMB- ja PRF1-tasot nousivat aktiini B:hen normalisoituina 2.5-4.5-kertaisiksi (kuvaaja 4), mutta muiden potilaiden eksplanteista ei löytynyt merkittäviä aktiivisuusmuutoksia.

### 5.3 PDEC-viljelmien vaste immuunisoluja stimuloivaan lääkitykseen on korreloitavissa primäärikasvaimen ominaisuuksiin



Kuvaaja 4. Potilaiden P768T, P771T ja P774T IFN $\gamma$ -, GZMB- ja PRF1-ekspressiomuutokset vasteena immuunisoluja stimuloivaan lääkitykseen, sekä samojen potilaiden primäärikasvainten Myc- ja CD45-värjäykset.

Aineistoni potilaista yhden (P768T) PDEC-eksplanttien immuuniaktiivisuus moninkertaistui lääkityksen myötä, mutta kahden muun potilaan (P771T, P774T) eksplantteihin lääkityksillä ei ollut merkittävää vaikutusta (kuvaaja 4). Erityisesti potilaan P768T-eksplanttien immuuniaktivaation taso vaihteli myös käytetyn

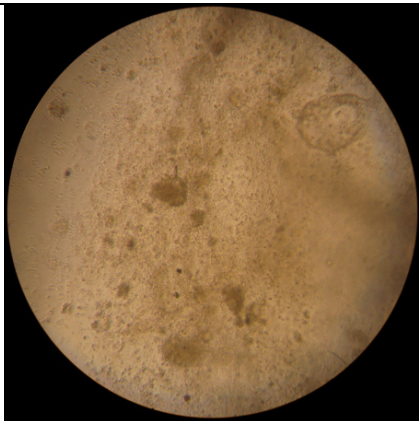
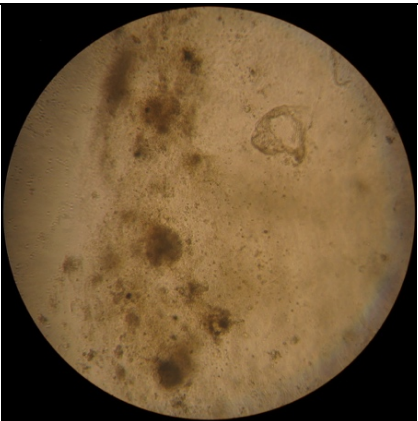
lääkityksen ja sen konsentraation mukaan. Kasvain, jonka eksplanttien immuunisoluaktiivisuus kasvoi eniten, oli myös vahvimmin Myc-yliekspressoitunut ja kasvaimen tunkeutuneiden leukosyyttien määrältään kaikista suurin. Potilaiden P771T ja P774T kasvaimen värjäyksistä nähdään, etteivät immuunisolut ole päässeet tunkeutumaan syöpäkudoksen sisälle.

Rintasyövän Myc-yliekspressio ei ollut aineistossani yhteydessä kasvaimen korkeaan leukosyyttimäärään (taulukko 2), vaan vahvasti CD45-positiivisesti värjäytyviä näytteitä oli yhtä paljon sekä Myc-yliekspressoituneissa että Myc:ä normaalitasolla ilmentävissä kasvaimissa.

cMyc (%)	Samples		CD45+	CD45-
	(n)			
60-100	6		2	4
0-60	6		2	4

Taulukko 2: cMyc- ja CD45-värjäysten tulokset.

PDEC-eksplanttien solufragmentit tiivistyivät solujen migraation seurauksena kasvatuksen aikana, mutta eksplanttien koon ja muodon muutoksissa ei ollut havaittavissa eroja eri lääkekäsittelyiden välillä (taulukko 3).

Patient	Day1	Day4
P771T, 5x $\alpha$ -PD-L1		

Taulukko 3: PDEC-eksplanttien koon muuttuminen kasvatuksen ensimmäisen ja neljännen päivän välillä.



## 6 Pohdinta

Tulokseni osoittavat, että tutkimusryhmämme kehittämät PDEC-viljelmät soveltuvat potilaan kasvaimen immuuni- ja syöpäsolujen vuorovaikutusten tutkimiseen. Malli toimii hyvin erityisesti potilailla, joiden kasvaimessa on runsaasti lymfosyyttejä: mikäli lymfosyyttien osuus kasvaimen kaikista soluista on hyvin pieni, niin käyttämäni protokollat eivät kykene kuvaamaan erilaisten lääkitysten immuunisoluja stimuloivia vaikutuksia kuvaavien mRNA-tasojen eroja luotettavasti. Tutkimukseen saamieni potilasnäytteiden lymfosyyttimäärässä oli selkeitä eroja, mutta mikäli qRT-PCR:llä saatua tietoa immuunisolujen aktiivisuudesta haluttaisiin käyttää prognostisena tekijänä, niin matala- ja korkea-asteinen lymfosyytti-infiltraatio pitäisi määritellä tarkemmin. Lisätutkimusta vaatisi myös se, aiheuttaako mitatun immuunisoluaktiivisuuden kasvainnäytteiden entsyymikäsittelyn myötä stroomasta syöpäsolujen joukkoon päätyvät vai kasvaimen jo elimistössä päässeet lymfosyytit. Potilaan P774T-immuuniaktivaatiotulosten perusteella vaikuttaisi siltä, etteivät strooman lymfosyytit aiheuta häiriötä immuuniaktivaatiomittauksissa. Voidaan siis olettaa, että qRT-PCR:llä mitattu immuuniaktiivisuus kuvastaa aidosti kasvaimen sisälle päässeiden lymfosyyttien aktiivisuutta, mutta tutkimukseni otoskoko ei ole riittävä suurempien johtopäätösten vetämiseen.

Vaikka qRT-PCR kykenee havaitsemaan pienetkin erot näytteiden mRNA-tasoissa, niin myös käyttämäni protokollaa tulisi vielä optimoida. Rintasyöpäleikkauksista saamamme näytteet ovat usein niin pieniä, että kun näytteen solut jaetaan kahdeksaan eri eksplantiin erilaisia lääkekäsittelyitä varten, niin yhden eksplantin solumäärä jää helposti qRT-PCR-tutkimusten kannalta liian pieneksi. Soluväliainetta mallintava Cultrex saattaa myös häiritä käyttämäämme Qiagenin RNA-eristysprotokollaa niin, ettei lopulliseen näytteeseen välttämättä tule kaikkea viljellyn potilaskudoksen RNA:ta ja mukaan voi päätyä myös DNA:ta. Huomasin tämän cDNA-synteesin yhteydessä valmistamistani -RT-kontrolleista, jotka olivat qRT-PCR-ajossa positiivisia käänteiskopioijaentsyymien puuttumisesta huolimatta. Laboratoriossamme ei myöskään ole erillistä RNA-työskentelyyn tarkoitettua steriiliä tilaa, joten käytin RNA-eristykseen normaalia vetokaappia, millä saattaa olla vaikutusta

tutkimustuloksiini. Vertasin PDEC-eksplanttien immuunisoluaktiivisuutta kahden solujen ylläpitogeenin, GAPDH:n ja aktiini B:n tasoihin. Näistä jälkimmäinen kuvasi näytteiden välisiä eroja selkeästi paremmin. Tämä saattaa johtua esimerkiksi siitä, että suuri osa PDEC-eksplanttien soluista ehtii kuolla kasvatuksen aikana, jolloin solun glykolyysiaktiivisuutta kuvaavaan GAPDH-mRNA-tasoon vertaaminen ei välttämättä enää kuvasta alkuperäisten näytteiden välisiä eroja yhtä luotettavasti kuin solun tukirankaan kuuluvan aktiini B:n määrän mukaan normalisoiminen.

Sain tutkimukseeni vain neljän rintasyöpäpotilaan näytteet, joten myös pienellä otoskoolla saattaa olla vaikutusta saamiini tuloksiin. Reliabiliteetin parantamiseksi harjoittelin kaikkia käyttämiäni protokollia muutaman kerran ennen varsinaisen tutkimusaineistoni keräämistä, sekä toistin tutkimukseni solulinjavaiheen lääkekäsittelyt neljä kertaa. Käytin PDEC-eksplanteista esittämiini tuloksiin kahden teknisen qRT-PCR-toiston tulosten keskiarvoja, mutta näin pienellä potilasnäyte- ja toistomäärällä virheellisten tutkimustulosten merkitys jää vielä hyvin suureksi. Jatkotutkimuksissa jokaisen potilasnäytteen qRT-PCR-protokolla tulisi toistaa kolmesti ja käytettyä potilasnäytemäärää täytyisi kasvattaa reliabiliteetin parantamiseksi. Vaikka löysinkin qRT-PCR:llä merkittäviä eroja PDEC-eksplanttien immuuniaktivaatiossa, niin menetelmällä mitattava mRNA-määrän nousu ei myöskään välttämättä ole ainoa tapa, jolla solut lisäävät IFN $\gamma$ -, GZMB- ja PRF1-aktiivisuuttaan. Transkriptionaalisen säätelyn lisäksi on hyvä pitää mielessä myös esimerkiksi proteiinien solusta vapautumiseen ja niiden post-translationalisiin modifikaatioihin liittyvä säätely, jolla on vaikutusta immuunisolujen aktiivisuuteen vaikkei sitä saadakaan mitattua qRT-PCR:llä. Värjäyksiin käyttämäni cMyc- ja PD-L1-vasta-aineet ovat myös olleet runsaasti muiden ryhmämme tutkijoiden käytössä, mikä on saattanut vaikuttaa aineiden toimivuuteen. Tilasimme CD45-vasta-aineen juuri omaa projektiani varten ja se toimikin käyttämästäni vasta-aineista ylivoimaisesti parhaiten. Myös immunohistokemiallisten tutkimusteni otoskoko jäi aikapaineen vuoksi melko pieneksi, joten Myc- ja PD-L1-värjäyksien yhteyttä kasvaimiin tunkeutuneiden lymfosyyttien määrään ja sijaintiin kannattaa tutkia jatkossakin.

Jatkotutkimusten kannalta on erityisen mielenkiintoista, että PDEC-viljelmien immuunisoluaktiivisuudessa on havaittavissa selkeitä sekä potilas- että lääkeainekohtaisia eroja. Potilaskohtaisia eroja voidaan hyödyntää potilaan immunoterapiavasteen ennustamisessa, kun taas lääkeainekohtaisten erojen avulla voidaan kehittää optimaalisella tavalla kasvaimen lymfosyyttejä aktivoivia lääkkeitä ja niiden yhdistelmiä. Immuno-onkologisten yhdistelmälääkitysten suurin ongelma tällä hetkellä on merkittävästi käytön myötä kohoava immunologisten haittavaikutusten, kuten autoimmuunitautien riski. Jos uudet olemassa olevien syöpähoitojen, täsmälääkkeiden ja immunoterapian yhdistelmät kykenevät sekä tuhoamaan syöpää että aktivoimaan kasvaimen immuunisoluja, niin saatamme löytää syöpäkudosta ilman immunosuppressiivisia vaikutuksia tuhoavia hoitomuotoja. PDEC-viljelmien avulla voidaan mallintaa lääkeyhdistelmien vaikutuksia sekä immuuni- että syöpäsoluihin, joten ne ovat erittäin käyttökelpoinen tutkimusala myös uusien yhdistelmälääkitysten tutkimukseen.

Suorien kliinisten sovellusten lisäksi PDEC-viljelmiä voidaan hyödyntää monipuolisesti myös perustutkimukseen. Vaikka perinteiset 2D-soluviljelmät, 3D-organoidit ja jysijämallit ovatkin moneen käyttötarkoitukseen hyvin soveltuvia tutkimusaloja, niin mikään niistä ei kuvaa kasvaimen tai muun kudospalan toimintaa yhtä kokonaisvaltaisesti kuin kaikki alkuperäisen kasvaimen solut sisältävät eksplantit. Perustutkimus on myöhemmän translationaalisen ja kliinisen tutkimuksen perusta, joten liian yksinkertaisten tutkimusmenetelmien aiheuttamaa harhaa tulee pyrkiä välttämään myös solutason mekanismeja tutkittaessa.

Koska terveydenhuoltojärjestelmämme perimmäinen tarkoitus on tuoda kansalle mahdollisimman paljon terveyttä käytettävissä olevalla budjetilla, niin myös rahallista puolta tulee miettiä: on turhaa maksaa suuria summia lääkityksestä, joka ei toimi. Tänä päivänä löydetyn tulevaisuuden lääkkeen saaminen laboratoriosta markkinoille kestää noin 10-15 vuotta ja maksaa keskimäärin yli miljardi euroa (43). Syöpälääketutkimuksessa luvut ovat vielä suurempia, sillä onkologiset kliiniset kokeet kestävät kaikista lääketieteen erikoisaloista ylivoimaisesti kauimmin. Jos pystyisimme jatkossa ennustamaan potilaan



immunoterapiavastetta luotettavasti ilman, että hänen tarvitsee kokeilla kymmenien tuhansien eurojen lääkkeitä, niin syövän lääkehoidosta tulisi merkittävästi kustannustehokkaampaa ja turvallisempaa. PDEC-viljelmien voidaan ajatella edustavan potilaan syöpää pienoiskoossa ja potilaan omasta kasvainkudoksesta saatu tutkimustieto tuo runsaasti uusia mahdollisuuksia syöpähoidon yksilöllistämiseen.

## Lähteet ja liitteet

1. Syöpärekisteri S. Syöpä 2016 -raportti. 2016 08.02.2019.
2. Kellokumpu-Lehtinen PL BP. Immuno-onkologian esiinmarssi. Duodecim. 2016;132(8):693-5.
3. Wong CH, Siah KW, Lo AW. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. Biostatistics. 2018;20(2):273-86.
4. Haikala HM, Anttila JM, Marques E, Raatikainen T, Ilander M, Hakanen H, et al. Pharmacological reactivation of MYC-dependent apoptosis induces susceptibility to anti-PD-1 immunotherapy. Nat Commun. 2019;10(1):620.
5. Breast cancer statistics: World Cancer Research Fund; 2018 [Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/breast-cancer-statistics>].
6. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. Lancet. 2017;389(10074):1134-50.
7. Syöpäpotilaiden eloonjääminen: Syöpäjärjestöt; 2016 [Available from: <https://www.syopajarjestot.fi/julkaisut/raportit/syopa-suomessa-2016/syopapotilaiden-eloonjaaminen/>].
8. Rintasyöpä Kaikki syövästä2019 [Available from: <https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/syopataudit/rintasyopa/>].
9. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. Science. 2017;355(6331):1330-4.
10. Marra A, Viale G, Curigliano G. Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. BMC medicine. 2019;17(1):90.
11. Polyak K, Metzger Filho O. SnapShot: breast cancer. Cancer Cell. 2012;22(4):562-e1.
12. Heng B, Lim CK, Lovejoy DB, Bessede A, Gluch L, Guillemin GJ. Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. Oncotarget. 2016;7(6):6506-20.
13. Invasive Breast Cancer (IDC/ILC): American Cancer Society; 2017 [updated 25/09/2017. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/invasive-breast-cancer.html>].
14. Truin W, Roumen RMH, Siesling S, van de Vijver KK, Tjan-Heijnen VCG, Voogd AC. Estrogen and progesterone receptor expression levels do not differ between lobular and ductal carcinoma in patients with hormone receptor-positive tumors. Breast Cancer Res Treat. 2017;164(1):133-8.
15. Molecular Subtypes of Breast Cancer: Breastcancer.org; 2019 [Available from: <https://www.breastcancer.org/symptoms/types/molecular-subtypes>].
16. Pauliina Munne MS, Iiris Juopperi, Iiris Rätty, Juha Klefström. Kuinka pitää syöpä hengissä? Duodecim. 2018;134(8):784-92.
17. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. Physiology (Bethesda). 2017;32(4):266-77.
18. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. Nat Rev Cancer. 2018;18(7):407-18.
19. Lamprecht Tratar U, Horvat S, Cemazar M. Transgenic Mouse Models in Cancer Research. Front Oncol. 2018;8:268.

20. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4:12.
21. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell.* 2018;172(1-2):373-86.e10.
22. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol.* 2016;18(3):246-54.
23. Brück OK, Mikko; Dufva, Olli; Kreutzman, Anna; Mustjoki, Satu. T-solut ja syöpä - miksi tappajat uupuvat? *Duodecim.* 2016;132(21):1984-92.
24. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
25. Martinez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2015;21(22):5047-56.
26. Santos PM, Butterfield LH. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *J Immunol.* 2018;200(2):443-9.
27. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Dual Faces of IFN $\gamma$  in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2016;22(10):2329-34.
28. Allard B, Aspeslagh S, Garaud S, Dupont FA, Solinas C, Kok M, et al. Immunology-101: overview of major concepts and translational perspectives. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 2):1-11.
29. Haikala HM, Anttila JM, Marques E, Raatikainen T, Ilander M, Hakanen H, et al. Publisher Correction: Pharmacological reactivation of MYC-dependent apoptosis induces susceptibility to anti-PD-1 immunotherapy. *Nature communications.* 2019;10(1):932.
30. Chretien S, Zerdes I, Bergh J, Matikas A, Foukakis T. Beyond PD-1/PD-L1 Inhibition: What the Future Holds for Breast Cancer Immunotherapy. *Cancers.* 2019;11(5).
31. Gill LS. Maximizing Immuno-Oncology Clinical Trial Success Applied Clinical Trials 2018 [Available from: <http://www.appliedclinicaltrials.com/maximizing-immuno-oncology-clinical-trial-success>.
32. Buisseret L, Garaud S, de Wind A, Van den Eynden G, Boisson A, Solinas C, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology.* 2017;6(1):e1257452.
33. Horiuchi D, Kusdra L, Huskey NE, Chandriani S, Lenburg ME, Gonzalez-Angulo AM, et al. MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J Exp Med.* 2012;209(4):679-96.
34. Casey SC, Baylot V, Felsner DW. The MYC oncogene is a global regulator of the immune response. *Blood.* 2018;131(18):2007-15.
35. Fallah Y, Brundage J, Allegakoen P, Shajahan-Haq AN. MYC-Driven Pathways in Breast Cancer Subtypes. *Biomolecules.* 2017;7(3).
36. Baik CS, Rubin EH, Forde PM, Mehnert JM, Collyar D, Butler MO, et al. Immunology Clinical Trial Design: Limitations, Challenges, and Opportunities. *Clin Cancer Res.* 2017;23(17):4992-5002.

37. Rozeman EA, Menzies AM, van Akkooi ACJ, Adhikari C, Bierman C, van de Wiel BA, et al. Identification of the optimal combination dosing schedule of neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma (OpACIN-neo): a multicentre, phase 2, randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2019.
38. Teixido C, Vilarino N, Reyes R, Reguart N. PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1758835918763493.
39. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? *The Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(13):2835-40.
40. Luen SJ, Savas P, Fox SB, Salgado R, Loi S. Tumour-infiltrating lymphocytes and the emerging role of immunotherapy in breast cancer. *Pathology*. 2017;49(2):141-55.
41. Mehnert JM, Monjazeb AM, Beerthuijzen JMT, Collyar D, Rubinstein L, Harris LN. The Challenge for Development of Valuable Immuno-oncology Biomarkers. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):4970-9.
42. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71-85.
43. Molekyylistä markkinoille - lääkkeen elinkaari Laaketutkimukset.fi: Lääketietokeskus Oy; 2019 [02/07/2019]. Available from: <http://www.laaketutkimukset.fi/laakkeen-elinkaari>.

Taulukko 1. Käytetyt vasta-aineet, lääkkeet, laitteet ja muut tarvikkeet.

Käyttökohde	Nimi	Valmistaja	Kataloginumero
PDEC	Immunocult Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator	StemCell Technologies	#10970
	Anti-PDL1 6E11.mlgG2a.LALAPG	Genentech	6E11
	Excella E24 Incubator shaker	New Brunswick Scientific	
Soluviljely	MammoCult Basal Medium (Human)	StemCell Technologies	#05621
	RPMI 1640 Medium (1x)	Gibco	#31870-025
	MammoCult Proliferation Supplements (Human)	StemCell Technologies	#05622

	Collagenase from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich	C5138
Immunohistokemia	Human CD45 ab	R&D systems	MAB1430
	Anti-PD-L1 Rb mab to PD-L1	Abcam	205921
	Recombinant Anti-c-Myc antibody [Y69]	Abcam	Ab32072
	Antigen retrieval solution	DAKO	
qRT-PCR	iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad	#1708882
	iScript RT Supermix for RT-qPCR	Bio-Rad	#1708841
	Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Bio-Rad	Control 64227409
	Molecular Biology water	Accugene	
	Tube Strips + Domed CapStrips	Nibbon Genetics	#FG-016DC
	Frame Star 480 with qPCR Adhesive Seal	4titude	#4ti-0952.
RNA-eristys	RNeasy mini kit 250	Qiagen	#74106

Taulukko 2. PCR alukkeet (Sigma).

1. *IFNy*; fw 5' TTTAATGCAGGTCATTCAGATG 3', rev AGACAATTTGGCTCTGCATT.
2. *PRF1*; fw 5' CGCCTACCTCAGGCTTATCTC 3', rev 5' CCTCGACAGTCAGGCAGTC 3'.
3. *GZMB*; fw 5' CCCTGGGAAAACACTCACACA-3', rev 5' CACAACTCAATGGTACTGTCGT 3'.

4. *GAPDH*; fw 5' CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC 3', rev 5' GCCCAATACGACCAAATCC 3'.
5. *ACTB*; fw 5' CTTCAACCACCACGGC 3', rev CCATCTCTTGCTCGAAG 3'.